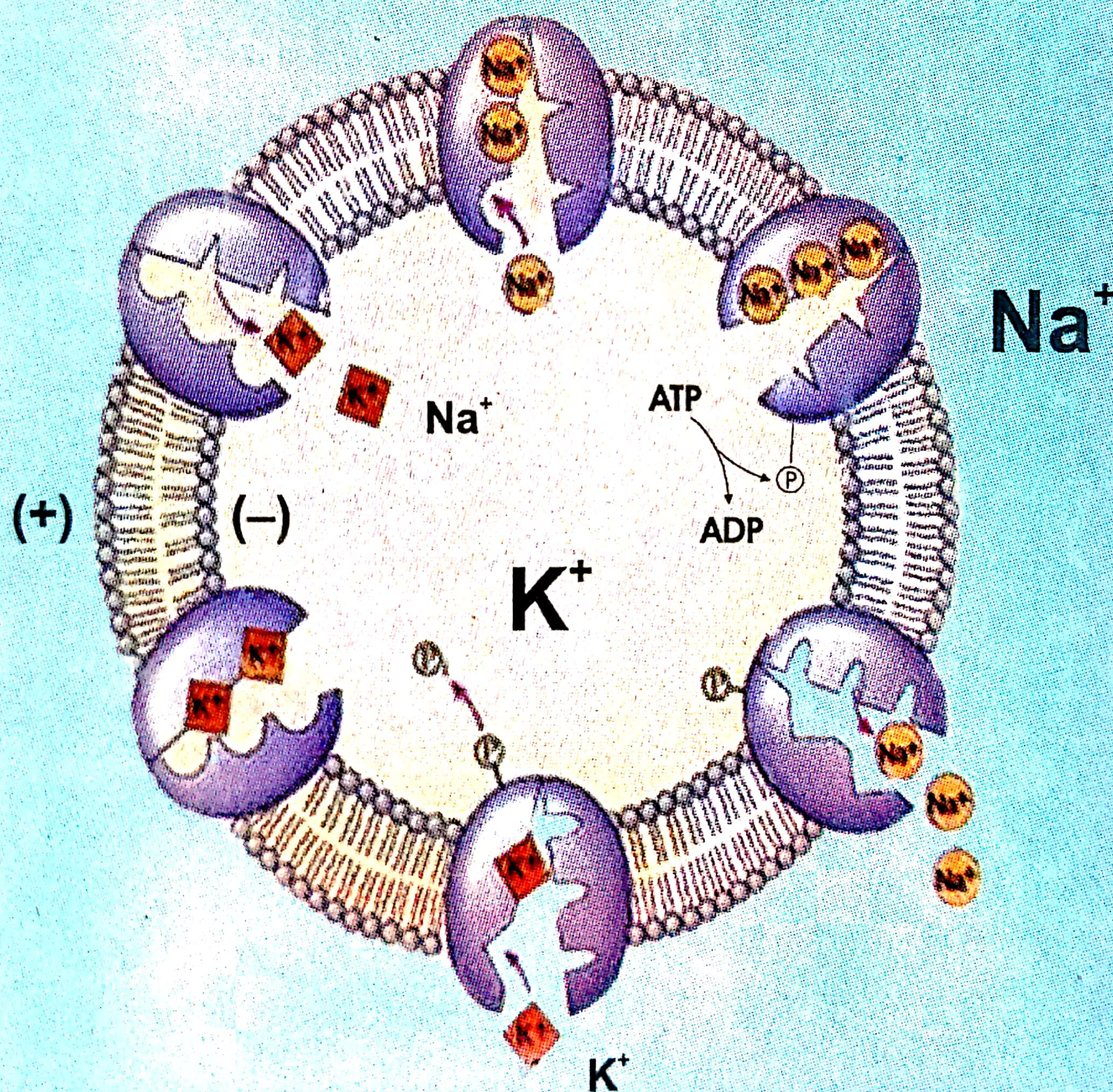
Colecția BIOINGINERIE MEDICALĂ

Rodica Maria ISAC

Florin TOPOLICEANU **Dorina E. CREANGĂ**

INTRODUCERE ÎN BIOFIZICA MOLECULARĂ ŞI CITOTISULARĂ



Editura "APOLLONIA" – Iaşi – 2002

Colecția BIOINGINERIE MEDICALĂ

Rodica M. Isac   Florin Topoliceanu   Dorina E.Creangă

INTRODUCERE ÎN BIOFIZICA MOLECULARĂ ȘI CITOTISULARĂ

Dnei Alexandra-Lucia Popescu, cu simpatie din partea autorului,

20 oct. 2004

ISBN 973–9333–38–9



Editura Apollonia
Iași – 2002

CUPRINS

Cuvânt înainte

Ca specialitate de graniță a științelor fiziologice, care studiază procesele biologice din punct de vedere fizic, Biofizica a devenit în ultimele decenii una din disciplinele de bază ale învățământului biomedical și tehnic. Coborând de la nivel de organism întreg la nivel celular și subcelular, această nouă disciplină contribuie substanțial la descifrarea și înțelegerea multora din manifestările electro-chimice și proprietățile biologice ale materiei vii.

Apariția unor materiale elaborate de specialiști ai domeniului este mai mult decât binevenită. Ea acoperă un gol resimțit încă, în țara noastră atât pe plan cognitiv cât și din punct de vedere aplicativ.

"Introducere în biofizica moleculară și citotisulară", editată de Rodica Maria Isac, Florin Topoliceanu și Dorina Emilia Creangă, reprezintă un astfel de material util instruirii studenților în bioinginerie, medicină și biologie. Cele 18 capitole care compun volumul, conțin principalele cunoștințe clasice și noi, referitoare la bazele morfo-chimice și electrofiziologice ale diverselor forme de activitate celulară.Rând pe rând sunt expuse particularitățile structurale și electrochimice ale principalilor constituienți celulari și subcelulari, insistându-se asupra rolului lor în realizarea diverselor forme de activitate celulară și tisulară.

O atenţie deosebită este acordată fenomenelor biofizice care stau la baza electrogenezei şi schimburilor ionice membranare generatoare de răspunsuri celulare specifice.

Datele de biofizică celulară şi moleculară sunt întregite de elemente de biomecanică şi biocibernetică informaţională.

In ansamblu, materialul eleborat de autori reprezintă o realizare didactică utilă fundamentării cunoştinţelor biomedicale şi tehnice pe baze biofizice corecte şi actuale.

Iaşi, aprilie 2000 Academician Ioan Haulică

Prefață

Acest volum deschide seria problematicilor actuale din domeniul de Biofizică și se adresează în special studenților Facultății de Bioinginerie medicală, dar și celor interesați prin specificul formării lor interdisciplinare, să aibă acces la avalanșa informațională din domeniul științelor bio- și tehnico-medicale, în care această disciplină de graniță și-a căpătat un loc privilegiat.

Elementele de Biofizică sunt structurate pe tematici care fără să aibă pretenția de a fi exhaustive, vin să completeze cunoștințele dobândite prin integratele de biologie generală și sistemică, în cadrul modulelor de biologie celulară și moleculară, citohistologie, biochimie, fiziologie,biometrologie și bioinstrumentație medicală.

Abordarea biofizică prin prisma științelor exacte ale unor probleme ca cele de modelare matematică, termodinamică, biochimică, biomecanică sau electrochimie sunt facile pentru studenții și viitorii practicieni în bioingineria medicală,dat fiind accesul acestora la o curriculă interdisciplinară complexă. De altfel, în aceasta seregăsesc inserate în mod coerent, alături de științele biomedicale și umaniste, cele de matematică – informatică, fizică – chimie, teoria sistemelor, știința și tehnologia materialelor, electronica medicală și alte discipline cu caracter tehnico-medical.

Prezentarea fenomenelor de transfer, bioelectrogeneza, microreologia, biomecanica citotisulară, modelare-simulare, comunicare celulară și control senzitivo-senzorial, ca fenomene fundamentale ale biofizicii celuulare și sistemice, deschide o fereastră spre înțelegerea unor direcții prioritare ale

unui învăţământ medical cu un grad accentuat de tehnologizare. Dintre acestea, reţin în mod deosebit atenţia descrierea şi elucidarea unor procese complexe bioenergetice celulare la nivel infra- şi supra molecular cu largi aplicaţii în biotehnologie, biorobotică protetică, biocibernetica controlului şi reglării biosistemelor, biomateriale inteligente şi biomecanica sistemelor protetice, telemedicina, inteligenţa artificială, sau în tehnologiile de informatizare a sistemelor de sănătate.

În sprijinul formării inter- şi transdisciplinare a specialiştilor în bioingineria medicală s-a avut în vedere ca structurarea capitolelor de Biofizică generală să permită studenţilor accesul direct la problematica biostructurală, moleculară şi citotisulară, ca bază ulterioară a înţelegerii biofizicii sistemice, privind implicaţiile unor componente moleculare, infracelulare şi citotisulare, la realizarea principalelor dispozitive funcţionale ale biosistemului uman.

Sperăm că efortul nostru, finalizat în editarea unui prim volum din ciclul dedicat problemelor actuale ale disciplinelor de graniţă biomedicale şi tehnico-medicale, reprezintă un început în formarea complexă bio- şi tehnico-medicală, a viitorilor specialişti în profesiunea de bioinginer medical.

Extinderea cunoştinţelor abordate prin prisma moleculară, celulară şi sistemică a Biofizicii, devine utilă şi pentru cei interesaţi în domeniile conexe (fizicieni, chimişti, biologi, ingineri cu preocupări în electronica medicală, biomecanică, biotehnologie şi protetică medicală, biomatematică-informatică medicală), care sunt preocupaţi de realizarea unor colaborări în echipă, alături de medici şi bioingineri, în serviciile de asistenţă medicală, cercetare şi învăţământ superior medical.

Iaşi, aprilie 2000 Autorii

CAPITOLUL 1

Apa biostructurală şi interacţiuni moleculare

În mod excepţional *apa,* una din cele mai răspândite substanţe de pe globul pământesc este singurul lichid anorganic din organismul uman, fără de care nici un proces vital nu este posibil. Proporţiile de apă sunt variabile în raport cu vârsta şi cu cantitatea de ţesut adipos, acestea fiind mai reduse la obezi şi vârstnici (Tabelul 1).

Tabelul 1. Procentajul de apă din diferite ţesuturi

(după F. Gremy şi J. Perrin 1975)

Tipul de ţesut	Ţesut adipos	Spori de ciuperci	Organism uman adult	Ţesut hepatic	Ţesut nervos	Organismul meduzelor
Conţinut în apă	30%	45-50%	65-70%	73%	84%	95%

1.1. Structura şi proprietăţile apei

Structura chimică a apei este deosebit de simplă, iar proprietăţile sale fizico-chimice îi conferă un rol fundamental în menţinerea alcătuirii şi funcţionării edificiilor macromoleculare celulare (îndeosebi ale proteinelor şi acizilor nucleici).

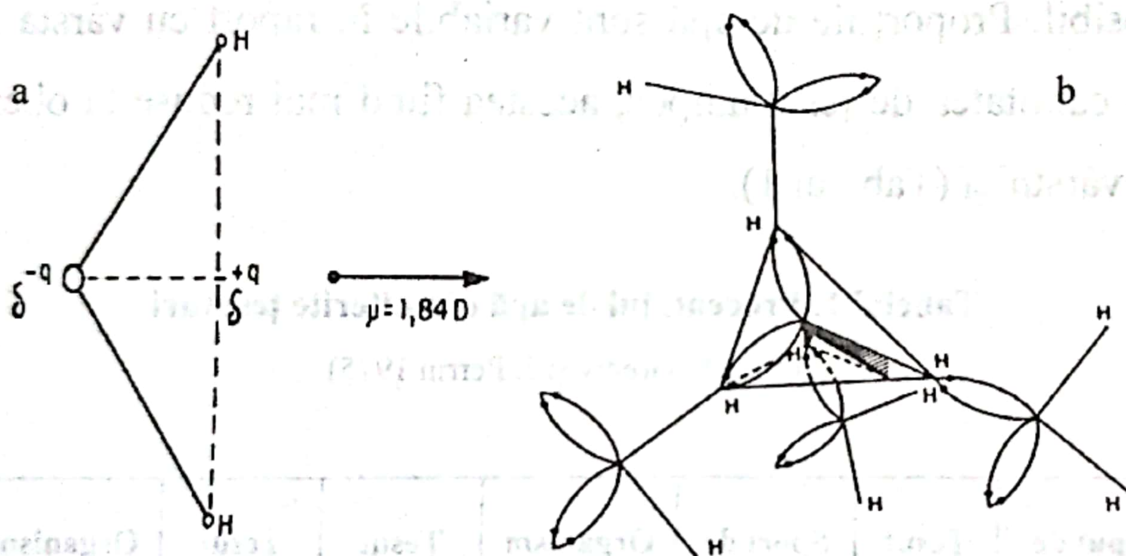


Figura 1. (a). - Structura plană a moleculei de apă şi orientarea momentului dipolar electric; (b) - Asocierea prin legături de hidrogen a moleculelor de apă (după F. Gremy, 1982).

Constanta dielectrică foarte mare (ε_r=80 la 20 °C) reprezintă reflectarea macroscopică a caracterului *dipolar electric pronunţat* a moleculelor de apă, valoarea acestuia fiind de 1,84 Debye (Figura 1a). Constanta dielectrică mare a apei îi

conferă remarcabile proprietăţi solubilizatoare mai ales că multe molecule organice sunt polare şi au o mare afinitate pentru apă (glucidele, majoritatea aminoacizilor, etc.) şi antrenează disocierea cristalelor ionice (săruri minerale).

La rândul lor moleculele de apă disociază în anioni oxidril HO^- şi cationi H^+, aceştia din urmă asociindu-se, de regulă cu molecule de apă nedisociate pentru a forma ionul H_3O^+.

Între moleculele de apă vecine se formează *legături de hidrogen,* deoarece protonii unei molecule sunt atraşi de atomii de oxigen ai moleculelor vecine (Figura 1b).

Caracterul dipolar electric şi existenţa legăturilor de hidrogen stau la baza celor mai multe dintre proprietăţile apei şi comportării sale în mediile biologice. Legăturile de hidrogen reprezintă un tip de interacţiuni slabe intermoleculare destul de răspândite în structurile macromoleculelor aşa cum se va menţiona şi în paragrafele următoare.

Lăsând la o parte detaliile legate de interacţiunile intermoleculare ale apei în stare lichidă sau solidă vom pune accentul pe de o parte, pe caracteristicile sale macroscopice în comparaţie cu alte structuri similare şi pe de altă parte pe variaţiile densităţii apei (0,91 g/cm^3) cu temperatura care atinge un maximum de 1 g/cm^3 la 4 ^{o}C .

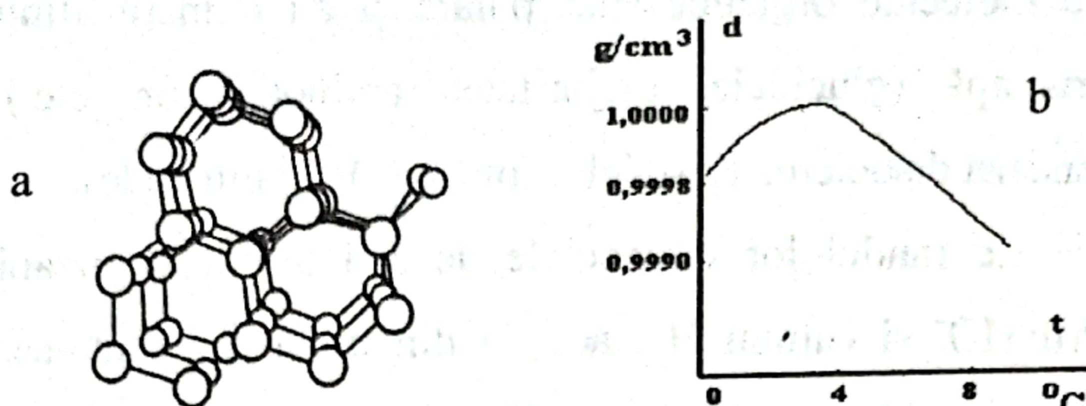


Figura 2. (a) - Structura cristalină a gheţii este bazată pe o reţea hexagonală de molecule legate între ele prin legături de hidrogen; (b) - Variaţia densităţii apei cu temperatura (după F. Gremy, 1982)

Alături de densitatea mai mică a gheţei, faţă de apa lichidiană se reţine şi structura de reţea hexagonală a moleculelor de apă transformate în gheaţă, concomitent cu mărirea volumului acesteia (Figura 2a – 2b). Datele menţionate atrag atenţia asupra problemelor de criobiologie, îngheţarea şi dezgheţarea biostructurilor fiind în centrul unor cercetări complexe interdisciplinare, privind conservarea non-distructivă şi funcţională a acestora.

Se avansează idea că dacă, la fel ca la alte substanţe, densitatea stării solide ar fi mai mare decât a celei lichide, gheaţa formată în anotimpul rece, ar cădea la fundul lacurilor, râurilor şi mărilor şi numai o mică parte din această gheaţă de adâncime s-ar putea topi la căldura soarelui în anotimpul cald;

astfel depozitele de gheaţă de pe fundul apelor ar fi permanente şi climatul ar fi total diferit.

Dintre proprietăţile fizico-chimice cele mai importante pentru rolul jucat în organism menţionăm *punctele de solidificare* (t_s) şi *vaporizare* (t_v), ele fiind sensibil mai ridicate decât la alte substanţe cu structură asemănătoare (H_2S, H_2Se, HeTe, etc.) sau cu acelaşi număr de opt electroni moleculari periferici (Ne, HF, NH_3, CH_4, etc.) (Figura 3).

Căldura de topire a gheţii este de 80 kcal/mol, iar cea de *vaporizare* a apei este de 537 kcal/mol. Eliminarea din organism prin vaporizare a unei cantităţi semnificative de energie (537 kcal), la fel ca şi valoarea ridicată a *căldurii specifice* (18 cal/mol.grad), evidenţiază rolul esenţial pe care apa îl îndeplineşte în cadrul mecanismelor de termoreglare.

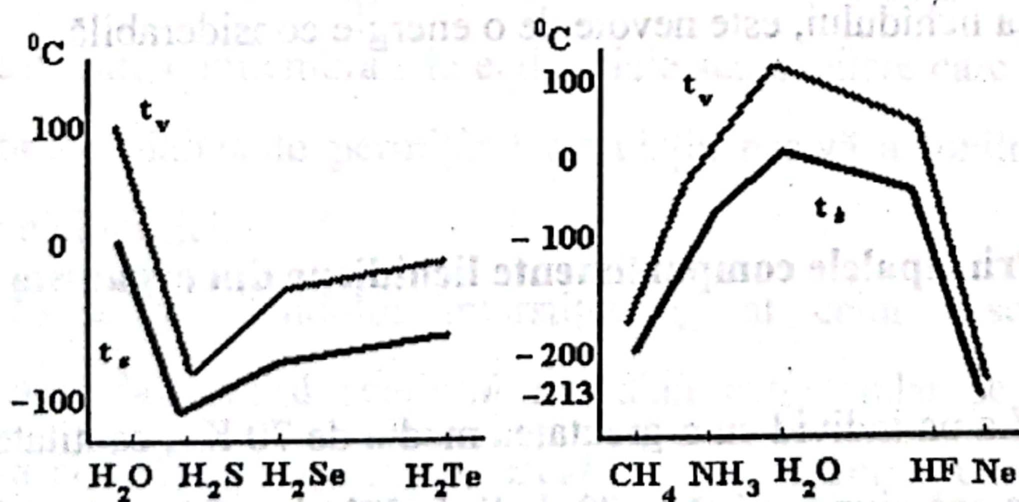


Figura 3. Punctele de solidificare şi de vaporizare ale apei în comparaţie cu alte molecule (modificat, după F. Gremy şi J. Perrin, 1975)

Vâscozitatea apei, reflectă nivelul interacţiunilor dintre moleculele de apă din straturile învecinate în timpul curgerii şi este relativ redusă, la 10^{-2} Poise la 20 °C faţă de glicerină, la care aceasta ajunge până la 15 Poise la temperatură echivalentă, fapt datorat legăturilor de hidrogen care se rup şi se refac cu mare frecvenţă în apa lichidă.

Tabel 2. Variaţia vâscozităţii apei cu temperatura
(după F. Gremy şi J. Perrin, 1975)

Temperatura (° C)	10	20	30	40
Vâscozitatea (centiPoise)	1,30	1,00	0,80	0,65

Tensiunea superficială a apei este relativ mare, de 73 erg/cm^2, datorită existenţei unui mare număr de interacţiuni intermoleculare, care pentru a le rupe şi a scoate o moleculă la suprafaţa lichidului, este nevoie de o energie considerabilă.

1.2. Principalele compartimente lichidiene din organism

La un individ cu o greutatea medie de 70 Kg, cantitatea totală de apă ajunge până la 70 de litri (57% la adult şi 75% la

noi născuţi din greutatea corporală). Obezitatea scade procentajul de apă corporală sub 45% din greutatea corporală.

Există două mari compartimente lichidiene în organism reprezentate de sectorul intracelular şi cel extracelular, subdivizat în sectoarele: interstiţial şi intravascular - plasmatic.

Delimitarea sectorului intracelular de cel extracelular este realizată de membranele celulare care asigură totodată şi comunicarea dintre acestea, prin microtransportul ionilor şi moleculelor mici, ca şi prin macrotransportul macromoleculelor şi a diferitelor particule.

Compartimentul intracelular conţine aproximativ 25 de litri de apă, în timp ce în compartimentul extracelular sunt stocate 15 litri de apă, distribuite între sectorul **interstiţial** (12 litri) şi **intravascular** (3 litri în componenta plasmatică şi 2 litri la nivelul celulelor sangvine). Aceste două subcompartimente sunt separate de membranele endoteliale sau capilare care sunt membrane dializante permiţând circulaţia pasivă a ionilor şi moleculelor mici.

În afara lichidului interstiţial şi al celui vascular plasmatic, la nivelul spaţiului lichidian extracelular se pot adăuga şi *lichidele aşa zis transcelulare* reprezentate de cele din cavitaţile seroase (pleură, pericard, peritoneu, articulaţii), lichidul cefalorahidian şi al diverselor secreţii (digestive,

lacrimale, oculare etc.) care ajung la 1-3% din greutatea corpului.

Ca lichid extracelular este considerată adesea şi limfa, deoarece vasele limfatice drenează spaţiul interstiţial (volumul limfatic fiind însă insuficient de precis determinat).

Tabelul 3. Repartiţia procentuală a apei în compartimentele lichidiene ale organismului uman (după F. Gremy şi J. Perrin, 1975)

Compartiment	Procente din greutatea corporală	
	Bărbaţi	Femei
Extracelular Interstiţial	10,9	10,7
Extracelular Intravascular	4,1	4,3
Intracelular	45	40
Total	60	55

1.3. Interacţiuni intermoleculare

În dinamica structurării şi dezvoltării organismului uman de la nivelul embriogenezei şi până la vârsta adultă edificiile moleculare şi macromoleculare (în special proteice, glicoproteice sau lipoproteice de tip globular sau fibrilar), iau parte la morfogeneză şi la realizarea arhitecturii sistemului viu.

De-a lungul evoluţiei filogenetice şi ontogenetice, acestea se găsesc într-o continuă restructurare în cadrul unui turnover metabolic şi în prezenţa unor permanente interacţiuni la nivel molecular.

Dintre interacţiunile la nivel molecular de mică energie menţionăm: *legăturile de hidrogen, legăturile hidrofobe, interacţiunile dipol - dipol* şi *forţele ionice* (Tabelul 4).

Legăturile hidrofobe sunt cele existente între molecule sau grupări de atomi care nu au caracter polar de tipul moleculelor de apă

Interacţiunile dipol - dipol se grupează, după natura dipolilor implicaţi, în mod permanent (interacţiuni Keeson) sau indus (interacţiuni Debye).

În contrast cu interacţiunile de mică energie, *legăturile covalente* sunt legături de energie mare - sute de kJ/kmol, asigurând stabilitatea structurilor moleculare. Pentru reprezentarea lor, în cadrul unor relaţii şi legi fizice sau chimice, s-au notat cu **q** şi **μ** sarcina electrică şi respectiv momentul dipolar electric, iar cu **α** şi **k** au fost notate polaritatea electrică şi respectiv constanta care exprimă gama proprietăţilor electrice ale mediului prin care se transmit interacţiunile (invers proporţională cu permitivitatea electrică).

K_B este constanta lui Boltzman, T_r include T ca

Tabelul 4. Principalele tipuri de interacţiuni moleculare

(modificat, după F. Gremy, 1982)

Tipul legăturii	Relaţii cantitative	Valoarea energiei kJ/kmol	Exemple
Covalente		400-800	Structuri moleculare la molecule mici, structuri primare la proteine şi acizi nucleici
Ionice (între grupări încărcate cu sarcină electrică)	$k\frac{q_1q_2}{r}$	5-20	Solubilizarea şi hidratarea ionilor
Sarcină-dipol permanent	$k\frac{\mu^2q^2}{3K_BTr^3}$	1-5	Proprietăţile polielectroliţilor
Sarcină-dipol indus	$k\frac{\alpha q^2}{r^3}$	0,5-2	Solubilizarea şi hidratarea ionilor
Interacţiuni Keesom (dipol permanent - dipol permanent)	$k\frac{\mu_1^2\mu_2^2}{3K_BTr^6}$	2-10	Mecanismul de stabilire al legăturii de hidrogen
Interacţiuni Debye (dipol permanent –dipol indus)	$k\frac{\alpha\mu^2}{r^6}$	1-5	Interacţiuni stereospecifice la distanţă mică la toate tipurile de grupări chimice
Interacţiuni London (dipol instantaneu - dipol instantaneu)	$k\frac{\alpha^2}{r^6}$	1-5	Interacţiuni stereospecifice la distanţă mică la toate tipurile de grupări chimice
Interacţiuni de hidrogen		8-40	Interacţiuni secundare ale proteinelor, împerecherea bazelor acizilor nucleici
Interacţiuni hidrofobe		4-30	Interacţiuni lipide-lipide, structuri terţiare ale proteinelor

temperatură absolută şi **r** este distanţă dintre centrele particulelor ce interacţionează.

Interacţiunile slabe, de natură fizică, intervin în cuplarea enzimă - substrat, în interacţiunea antigen - anticorp, în stabilitatea structurilor biomembranare, în recunoaşterea de către receptorii membranari a neurotransmiţătorilor şi hormonilor, precum şi a medicamentelor, asigurând schimbul de informaţie intercelular.

Interacţiunile intermoleculare ale apei cu substanţele dizolvate sau suspendate printre moleculele sale, determină în mare măsură proprietăţile soluţiilor şi suspensiilor apoase din organism, adică ale lichidelor din marile compartimente hidrice din care am amintit mai sus.

Importanţa protonilor hidrici din structurile celulare şi de la nivelul compartimentelor hidrice în fenomenele de transconformare, permeabilitate, electrogeneză, contractilitate şi vasomotricitate au constituit obiectul unor studii preferenţiale ale cercetătorilor ieşeni biologi, fiziologi, biofizicieni şi biochimişti (F. Topoliceanu 1974, F. Topoliceanu şi I. Haulică 1984, F. Topoliceanu şi I. Haulică 1989, M. Isac şi R. M. Isac 1985, M. Isac şi R. M. Isac 1989, M. Isac şi R. M. Isac 1990, M. Isac şi R. M. Isac 1991, M. Isac şi R. M. Isac 1992).

CAPITOLUL 2

Lipidele şi proprietăţile lor fizico-chimice

Lipidele reprezintă una din componentele importante ale structurilor vii, fiind constituienţi de bază ai ţesutului adipos şi ai sistemului de membrane celulare (plasmalema, membranele mitocondriilor, reticulul endoplasmic, etc.). Deoarece asupra aspectelor de biofizica membranelor ne vom referi mai în detaliu în capitolele următoare, precizăm că cele mai importante tipuri de lipide din membrană sunt: *fosfolipidele* (fosofgliceride şi sfingolipide) şi *glicolipidele* (Figura 4). Alcoolul cu care se asociază acizii graşi din compoziţia fosfolipidelor putând fi glicerol sau sfingozină, rezultă că deci avem de-a face cu fosfogliceride şi sfingolipide.

Dintre cele mai cunoscute lipide membranare menţionăm fosfatidilcolina (lecitina), fosfatidiletolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinozitolul. Unii autori, includ în rândul lipidelor şi moleculele de colesterol.

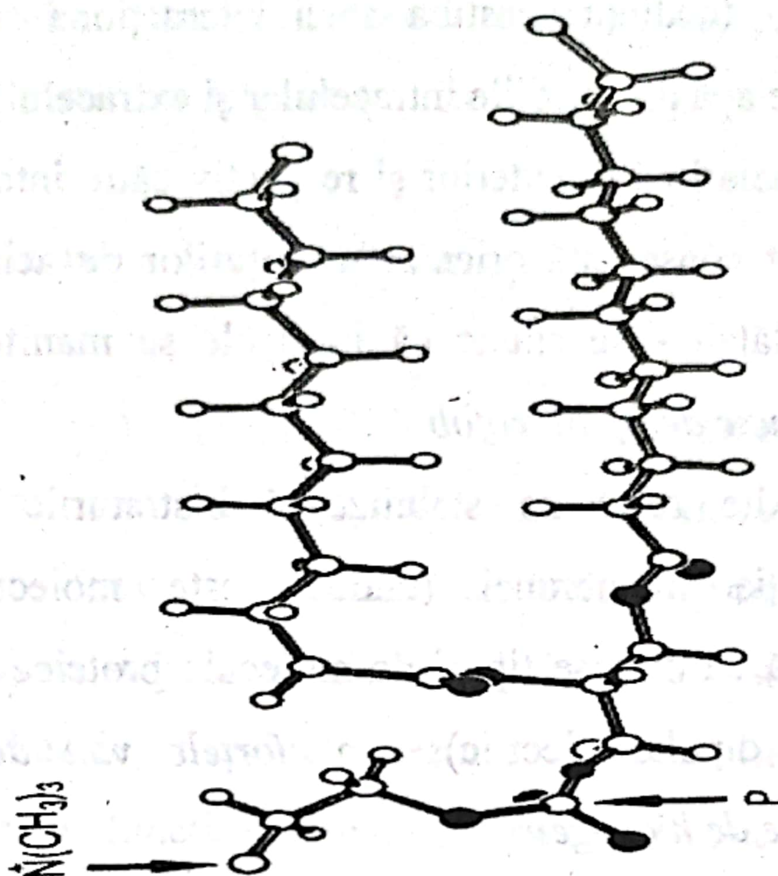


Figura 4. Structura unei molecule lipidice (după J. Darnell, 1970)

2.1. Structura lipidelor şi interacţiunile lor intermoleculare

Structura acestor molecule lipidice conţine în principal un *pol hidrofil* (un cap polar) şi două *lanţuri de acizi graşi saturaţi sau nesaturaţi (hidrofobe)*. În funcţie de natura acizilor graşi din straturile bilipidice din biomembrane acestea pot avea o fluiditate mai mare sau mai mică.

Organizarea în bistrat lipidic din membrane este consecinţa caracterului dipolar electric pe care îl prezintă polul

hidrofil - tendința acestuia de a interacționa cu moleculele polare de apă din mediile intracelular şi extracelular. Orientarea polilor polari către exterior şi respectiv către interiorul celulei are drept consecință orientarea lanțurilor de acizi grași unul către celălalt - se spune că între ele se manifestă *forțe de interacțiune de tip hidrofob.*

Alte forțe ce stabilizează bistraturile lipidice din compoziția membranei (unde aceste molecule coexistă împreună cu diverse tipuri de molecule proteice cu pronunțat caracter dipolar electric), sunt *forțele van der Waals şi legăturile de hidrogen.*

În mediile apoase *in vitro,* lipidele se organizează sub formă de micele globulare.Ele pot elimina apa din interiorul micelei unde se grupează lanțurile hidrofobe de acizi grași. Capetele polare rămân către exteriorul micelei interacționând prin legături electrice de tip dipol - dipol cu moleculele polare de apă.

Eliberarea moleculeleor de apă din spaţiul interior al micelei, duce la o creştere a entropiei sistemului, iar asocierea spaţială simetrică a lipidelor, duce la o scădere a acesteia.

Astfel de caracteristice energetice determină tendința de autoînchidere a acestor structuri cu delimitarea unor

compartimente, în care orice breşă reprezintă un inconvenient din punct de vedere energetic (G. Benga, 1976).

2.2. Organizarea sistemelor lipide-apă

Una din proprietăţile fizice remarcabile ale fosfolipidelor este *mezomorfismul*, adică existenţa stărilor intermediare între cea solidă şi lichidă (mezomorfism termotropic) ca şi între cea de cristal şi soluţie *mezomorfism liotropic.* Fazele liotrope prezintă şi ele *mezomorfism termotropic,* în funcţie de temperatură şi de concentraţia de apă.

Luzzatti şi col. (1968) au descris mai multe faze: *faza lamelară, faza de gel, faza hexagonală I şi faza hexagonală II.*

Faza lamelară (Figura 5), se caracterizează prin dispunerea bistratului lipidic cu lanţurile de acizi graşi orientate perpendicular pe axa determinată de polii hidrofili.

Faza de gel se caracterizează prin orientarea la un unghi de circa 30 de grade a lanţurilor de acizi graşi faţă de axa polilor hidrofili (Figura 6).

Faza hexagonală I este dată de micele globulare situate în colţurile şi centrul unui hexagon, moleculele polare din

mediul de dispersie fiind eliminate din interiorul micelelor (Figura 7a)

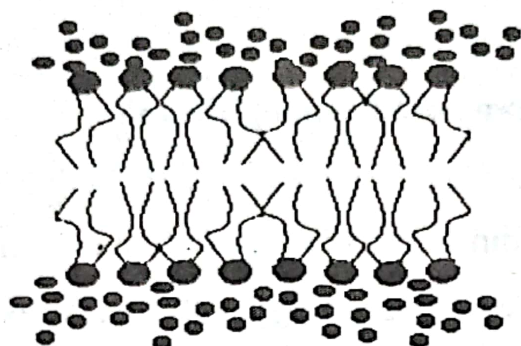


Figura 5. - Dublu strat lipidic organizat în *fază lamelară* în mediul exterior alcătuit din molecule polare

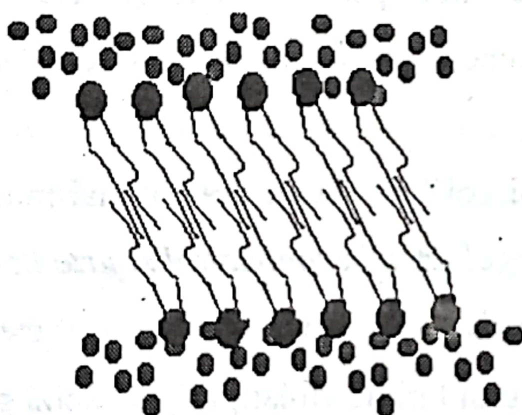


Figura 6. - Dublu strat lipidic organizat în *fază de gel* în mediul exterior alcătuit din molecule polare

Faza hexagonală II (Figura 7b) diferă prin aceea că, micelele prind în interior moleculele polare ale mediului de dispersie,în timp ce capetele polare ale lipidelor din micele sunt



orientate spre interiorul micelei, iar lanţurile de acizi graşi, hidrofobe, spre exterior.

Organizarea lipidelor membranare se bazează, în cazul celor mai multe din membranele organismelor superioare, pe forma de bistrat în faza lamelară, dar în cazul microorganismelor sau a membranei interne a mitocondriei, alături de porţiuni de bistrat lipidic lamelar apar şi micele de lipide.

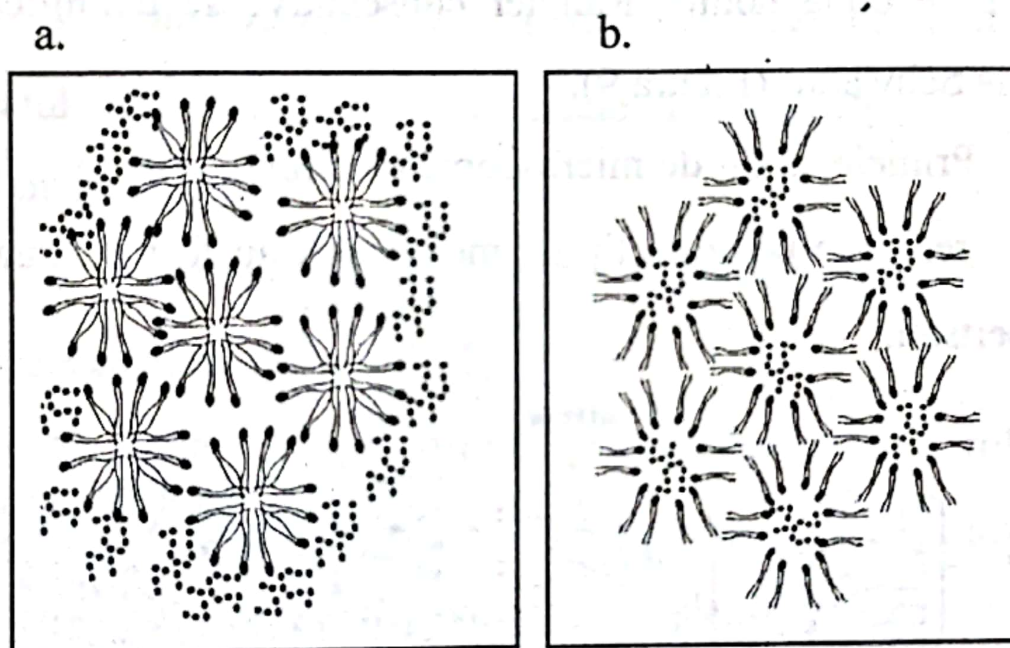


Figura 7. (a) - Lipide organizate în faza hexagonală I, în mediu alcătuit din molecule polare; (b) - Lipide organizate în faza hexagonală II, în mediu alcătuit din molecule polare

2.3. Teaca de mielină a axonului neuronal

La nivelul *neuronului teaca de mielină a axonului* are o pondere maximală a lipidelor incluse într-o structură

membranară, din care, circa 70 - 80% din greutatea uscată o reprezintă lipidele, sub formă de colesterol, fosfolipide, glicolipide şi doar 30% proteine (Figura 8).

Excluderea apei şi ionilor din compoziţia mielinei explică şi principala funcţie a acestei membrane, de izolator electric şi de barieră de permeabilitate pentru ioni.

Transportul ionilor prin membrana axonală se realizează la nivelul *nodurilor Ranvier*, unde teaca de mielină se întrerupe (iar între două noduri Ranvier consecutive se delimitează o celulă Schwann) (Figura 9).

Primele studii de microscopie electronică (înainte de anii ' 60), realizate pe acest tip de membrană, au fost efectuate de Robertson.

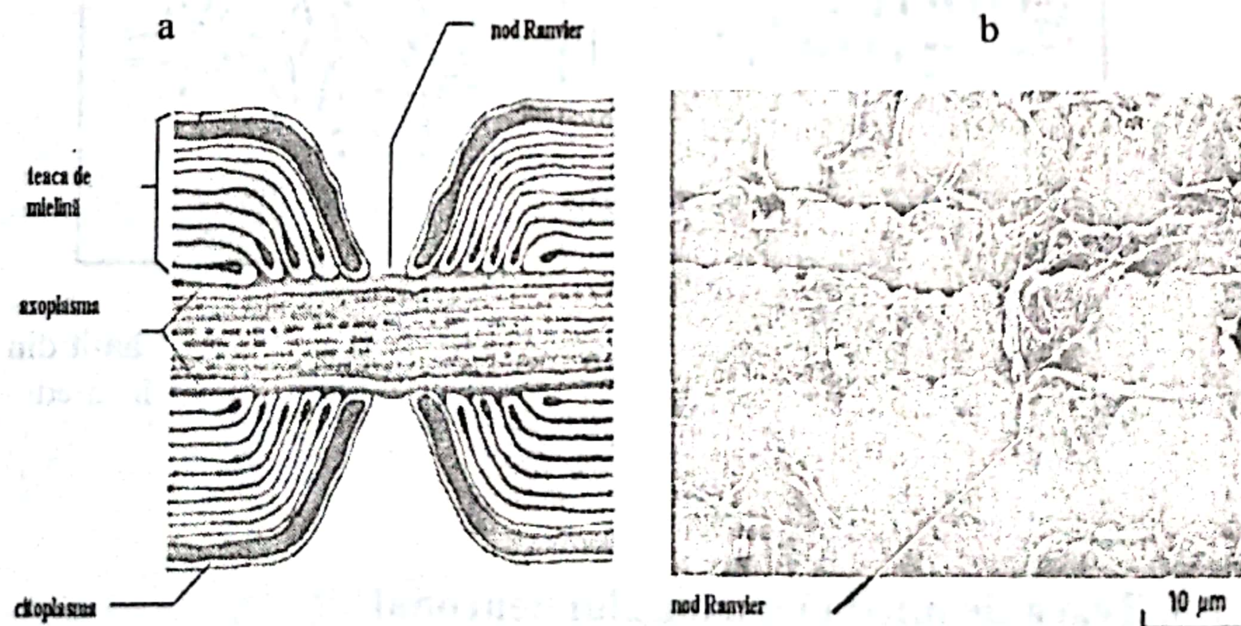


Figura 8. **a** - Reprezentare schematică a celulelor Schwann şi nodului Ranvier; **b** - Imagine obţinută la microscopul electronic (după J. Darnell şi col. 1990)

Acesta a relevat asimetria bistratului, dată de compoziţia chimică diferită a stratului lipidic intern faţă de cel extern, contribuind în mare măsură la perfecţionarea modelului structural propus anterior de Danielli şi Davson pe baza studiilor de tensiune superficială şi a celor de permeabilitate.

Glicolipidele constituie o parte semnificativă a lipidelor mielinice (30%), şi sunt reprezentate în special de:

∀ *galactocerebrozide* (ex.: galactozil-ceramida şi derivatul său sulfatide - implicate în interacţiuni celule Schwann – axon);

∀ *paraglobulinele* (ex.: sialozil-paraglobozide, implicate ca anticorpi anti LM_1);

∀ *sulfat de glucoronil paraglobozidă* cu rol în interacţiunea anticorp – anti SGPG, a căror perturbaţii stau la originea neuropatiilor senzitivo - motorii demielinizate.

Prezenţa glicolipidelor (glicosfingolipide, gangliozide, galactocerebrozide şi paraglobozide) şi încastrarea asimetrică în membrana plasmatică şi dublul strat lipidic prin componenta ceramidică, odată cu expunerea extracelulară a componentei glucidice constituie ţinta pentru autoanticorpi ce determină numeroase alterări ale canalelor ionice sau demielinizări mediate imunitar.

Distribuţia particulară a gangliozidelor (GM_1, $GD_{1a\ si\ b}$ şi GQ_{1b}) în membranele axonale cu precădere la nivelul nodulilor Ranvier, în regiunile paranodale sau sinaptice, cât şi în celulele Schwann, ale fibrelor motorii şi senzitive determină o largă varietate de afecţiuni clinice autoimune.

Acestea pot fi explicate prin implicarea lor în reglarea diverselor procese fiziologice cât şi prin interacţiunile lor cu receptorii factorilor de creştere, canale ionice, molecule de contractilitate şi recunoştere celulară (E. Fournier, 1998).

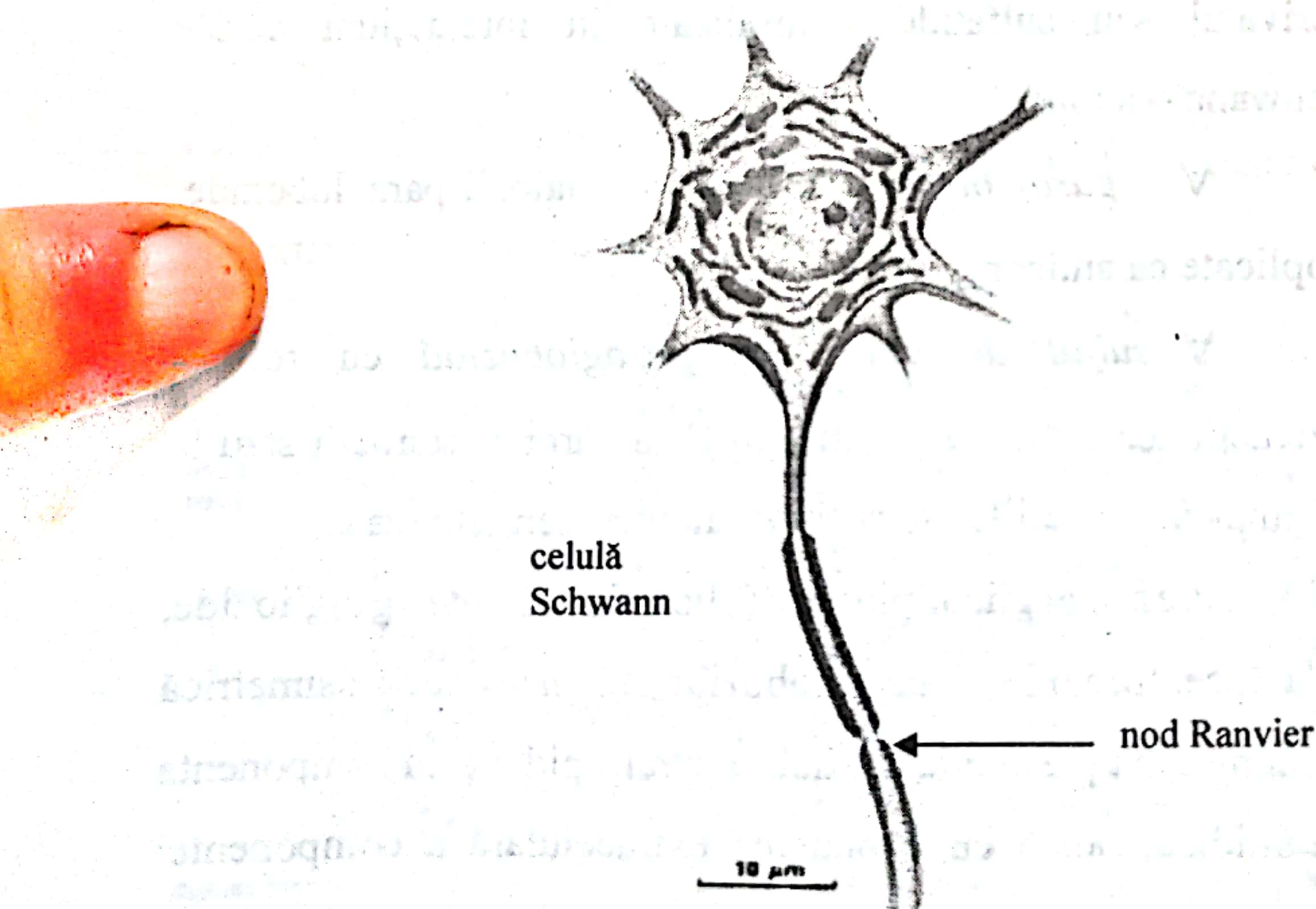


Figura 9. - Celula neuronală cu noduri Ranvier şi celule Schwann care sunt de-a lungul axonului mielinizat (după J. Darnell 1990)

În celelalte tipuri de membrane, lipidele au ponderi de numai 45 - 50% (modelul mozaicului fluid) coborând chiar la 30% în membranele care sunt bogate în proteine (modele bazate pe subunităţi lipoproteice sau pe micele de lipide) şi îndeplinesc funcţii celulare mai complexe.

CAPITOLUL 3

Proteine, interacţiuni moleculare şi proteine enzimatice catalitice.

Proteinele sunt macromolecule biologice care provin din polimerizarea unui număr mare (peste o sută) de molecule de aminoacizi. Cei douăzeci de aminoacizi existenţi în natură se caracterizează prin structuri de tipul **$H_2N.CH\textit{R}.COOH$** care diferă prin structura radicalului ***R***.

Aminoacizii sunt amfoliţi - putând să disocieze în mediu apos atât ca acizi cât şi ca baze. Legarea între moleculele de aminoacizi se realizează prin intermediul *legăturii peptidice* sau *aminice*, care apare prin redistribuirea densităţii norului electronic al grupărilor atomice **C=O** şi **NH**.

3.1. Legătura peptidică

Toţi cei patru atomi ai grupării peptidice sunt coplanari iar caracterul dipolar electric este semnificativ pentru gruparea peptidică (Figura 10). Unghiurile dintre legăturile interatomice

au valori apropiate de 120°, iar lungimea legăturii **C-N** din cadrul grupării peptidice este mai mică (1,32 Å) decât a legăturii **C-N** simple (1,47 Å).

Legăturile carbon - azot şi carbon - oxigen au un ordin intermediar între unu şi doi, ca urmare a deplasării unei părţi din densitatea electronică a legăturii duble **C=O** către legătura simplă **C-N**. Caracterul parţial de legătură dublă a legăturii **C-N** din gruparea peptidică împiedecă rotirea liberă în jurul acestei legături ceea ce nu este valabil şi pentru legătura simplă **C-N**.

Legăturile peptidice asigură *structura primară* a proteinelor şi înlănţuirea moleculelor de aminoacizi. Caracterul de donor de protoni al grupării **NH** şi caracterul de acceptor de protoni al grupării **C=O** favorizează formarea de *legături de hidrogen* între porţiuni vecine ale lanţului de aminoacizi, ceea ce reprezintă *structura secundară* a proteinelor.

Această structură se optimizează din punct de vedere energetic (energie minimă) şi entropic (entropie minimă) pentru un număr maxim de astfel de legături de hidrogen. Unele dintre aceste legături sunt între catene peptidice diferite (intercatenare), în timp ce altele sunt între porţiuni diferite ale aceleiaşi catene peptidice (intracatenare). Configuraţia spaţială conferită proteinelor de existenţa structurii secundare poate fi de *"α-helix"*, de *"foaie pliată"*, de *"ghem randomic"*, etc.

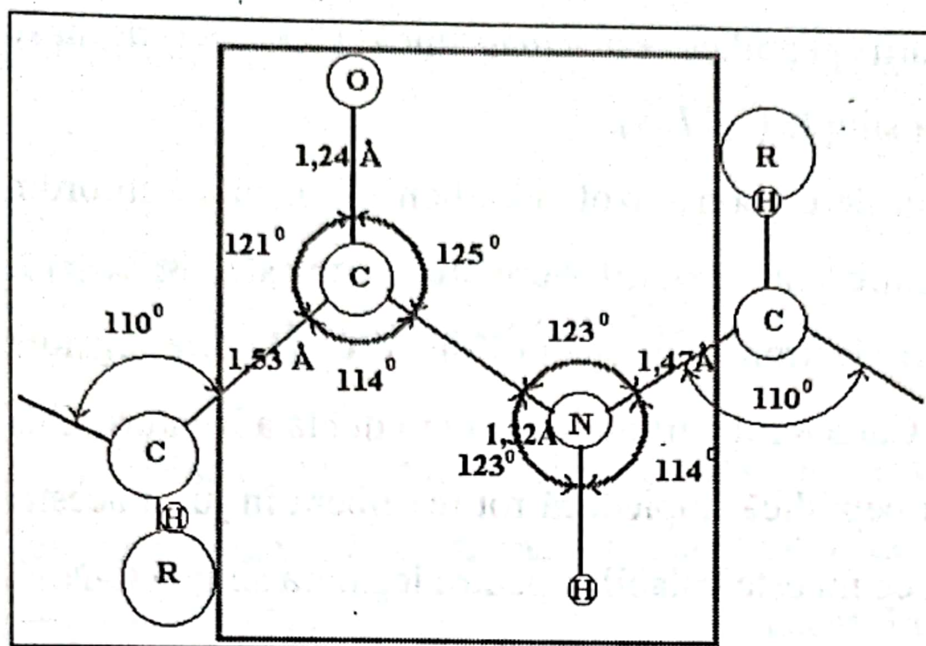


Figura 10. - Legătura peptidică şi caracteristicile sale configuraţionale (modificat după S. Bădilescu şi C. Bădilescu 1981)

Multe proteine au şi o *structură terţiară*, iar unele au chiar şi o *structură cuaternară* (Figura 11), ca urmare a formării de *legături disulfurice* (prin interacţiunea grupelor sulfhidril din moleculele aminoacizilor sulfuraţi), de *legături covalente difosfoesterice* (între molecule de serină), a *interacţiunilor ionice*, a *interacţiunilor hidrofobe* şi a noi *legături de hidrogen.*

Caracterul enzimatic al multor clase de proteine este consecinţa directă a existenţei structurilor terţiare, iar energia de legătură redusă a punţilor de hidrogen, face ca enzimele să fie uşor degradate termic, prin expunere la radiaţii sau prin

modificarea compoziţiei chimice a mediului de solvire a proteinelor respective.

Sub acţiunea unor factori fizici sau chimici proteinele pot suferi modificări de amploare mai redusă, parţial sau total reversibile denumite - *transconformaţii* sau modificări de mai mare amploare şi ireversibile cunoscute sub numele de - *denaturări*.

De remarcat, că la acţiunea unor agenţi fizico - chimici denaturanţi ca: *temperatura* (55-60 ^{0}C), *pH-ul, concentraţia ionică, presiunea, radiaţiile electromagnetice şi corpusculare,* se dezorganizează majoritatea legăturilor de hidrogen care asigură structura terţiară a multor enzime.

În cazul ribonucleazei, unde structura terţiară este asigurată de legături disulfurice, activitatea enzimatică este afectată abia la temperatura de 90 ^{0}C.

3.2. Proprietăţile semiconductoare ale proteinelor

Dintre proprietăţile fizice ale proteinelor, o poziţie particulară o deţine caracterul lor de *semiconductor*, determinat de electronii moleculari de tip π.

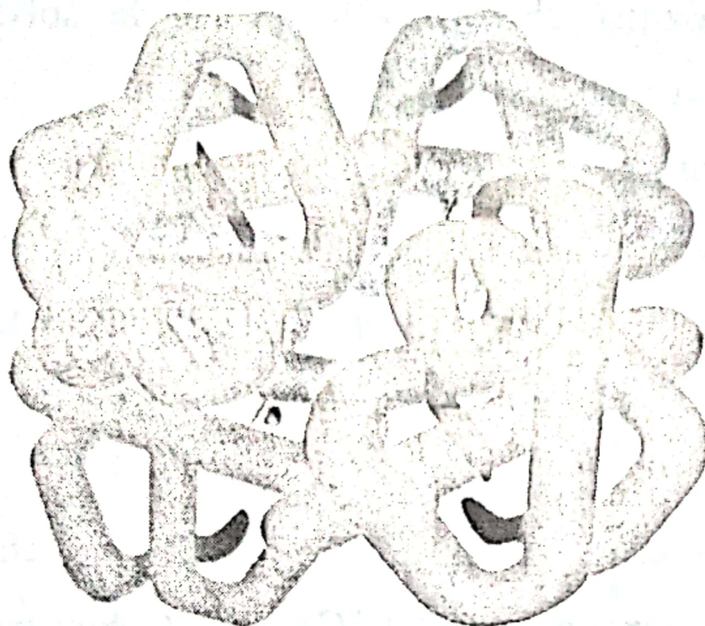


Figura 11. - Structura cuaternară a hemoglobinei din patru lanţuri peptidice (după M.F. Perutz citat de W. Hope şi col. 1983)

Rezistenţa electrică a proteinelor în stare uscată variază cu temperatura conform legii:

$$R = R_0 e^{\frac{\Delta\varepsilon}{2 k_B T}} \quad (1)$$

unde: $\mathbf{k_B}$ este constanta lui Boltzmann, $\mathbf{R_0}$ este rezistenţa electrică extrapolată pentru **1/T** tinzând la zero, iar $\Delta\varepsilon$ este lărgimea benzii interzise ce separă banda de valenţă de banda de conducţie (de ordinul a câţiva eV) (Figura 12).

Adsorbţia apei la suprafaţa unor proteine modifică lărgimea benzii interzise, de exemplu de la 2,2 eV la 1,7 eV în cazul albuminei plasmatice. Acest fapt poate fi explicat prin prisma a două ipoteze: prima se bazează pe efectul de modificare, de către apă, a *constantei dielectrice* a proteinei, iar a doua presupune că adsorbţia apei are efectul unei impurităţi.

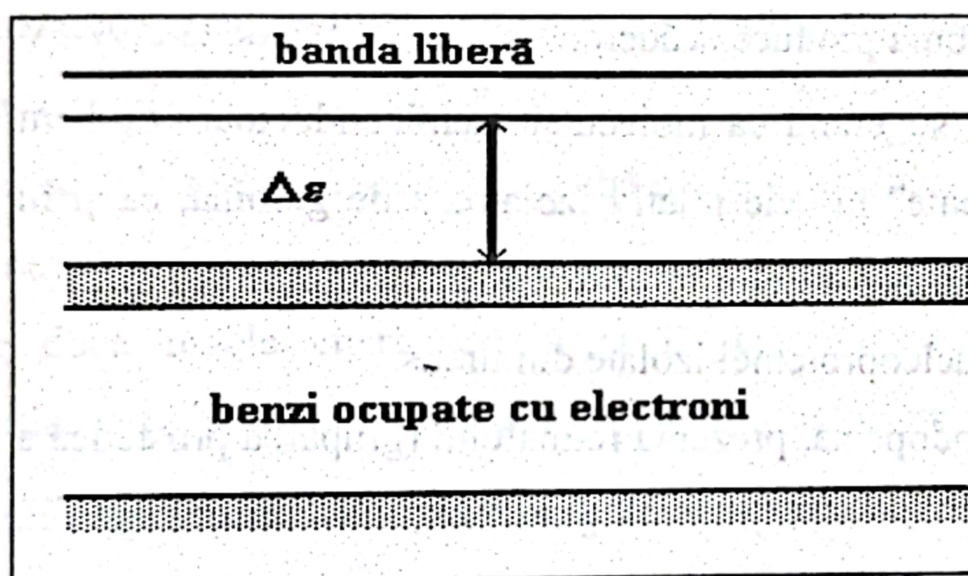


Figura 12. - Benzile energetice în proteine (Z. Simon şi C. Nicolau 1976)

În orice caz, mecanismul semiconductibilităţii proteinelor este cel mai probabil, unul electronic şi nu unul protonic.

S-a calculat că la nivelul grupărilor peptidice **C=O…HN** legate între ele prin legături de hidrogen se generează trei benzi de energie cu lărgimea de 0,2 eV, dintre



care cele două inferioare sunt complet ocupate de electroni, iar cea superioară este liberă. Distanţa dintre banda a doua ocupată de electroni şi banda liberă este apreciată la 3,05 eV.

S-a evidenţiat efectul grupărilor prostetice din proteine asupra lărgimii benzii interzise, arătându-se atât creşterea acesteia cât şi diminuarea ei, ca urmare a cuplării acestor grupe de atomi. Astfel, hemul (gruparea prostetică a hemoglobinei) cuplat la globină produce scăderea valorii lui $\Delta\varepsilon$ (de la 2,97 eV la 2,95 eV), sugerând că moleculele semiconductoare de hem sunt "îngropate" în cele relativ izolatoare de globină, ca şi în cazul cuplării moleculelor de la acidul nucleic **ADN**, în partea proteică a nucleoproteinei izolate din timus.

La rodopsină, prezenţa retinalului (gruparea prostetică a rodopsinei) duce la creşterea lărgimii benzii interzise a opsinei, ceea ce ar presupune că electronii π ai retinalului pătrund în banda de conducţie a proteinei, invers decât în cazul hemoglobinei.

Proteinele sunt molecule dipolare şi amfolitice, ceea ce face ca în structurile membranare, de exemplu, să participe la interacţiuni electrostatice şi ionice multiple.

Sinteza proteinelor de constituţie ca şi, de fapt, orice alt proces biochimic din celule, este controlată de proteinele

enzimatice a căror existenţă este determinată de informaţia genetică stocată în acizii nucleici.

3.3. Proprietăţi enzimatice

Rolul enzimelor de catalizatori ai reacţiilor metabolice poate fi ilustrat pe baza unui concept termodinamic fundamental pentru bioenergetica celulei cunoscută sub numele de *energie de activare*. Prin aceasta se înţelege faptul că moleculele reactante trebuie să aibă o energie minimă pentru a putea intra în reacţia respectivă. Această energie, **E,** delimitată de două nivele energetice **A** şi **B**, este necesară pentru declanşarea reacţiei, care decurge apoi spontan ca o reacţie exoenergetică (proces exergonic, între nivelele **A** şi **C** separate de energia internă **ΔG**) sau endoenergetică (proces endergonic).

Astfel este necesară depăşirea unei anumite bariere energetice pentru declanşarea unei reacţii biochimice ce se poate realiza, fie prin preluare temporară de energie (sub formă calorică, radiantă, ş.a.) din exterior, fie prin intervenţia biocatalizatorilor (ex.: enzimele), care reuşesc tocmai diminuarea barierei energice, de la o valoare **E,** prea mare

pentru intrarea în reacţie, la o valoare **E′** care face reacţia posibilă (Figura 13).

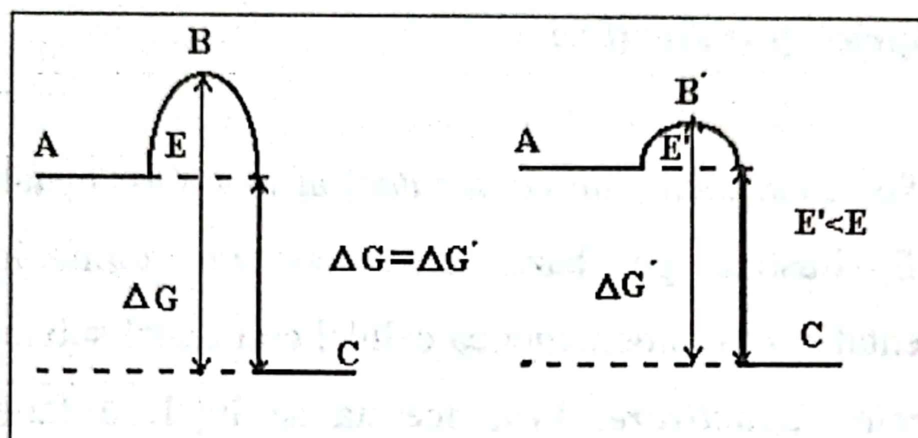


Figura 13. - Diminuarea energiei de activare de la *E* la *E′* la o reacţie exergonică cu energia de reacţie *ΔG** (după M. Isac 1987)

Prima cale este adesea neconvenabilă, căci necesarul de energie poate să fie prea mare, energizarea să nu fie economică sau să nu fie suportată de celulă. Acţiunea unor enzime specifice modificării substraturilor biomoleculare poate înlătura aceste neajunsuri, astfel ca celula să nu fie suprasolicitată energetic (Warren T.,1995)

Dacă energia unei reacţii, ca de exemplu eliberarea de energie din compuşii organici care sunt specializaţi în stocarea ei (cum ar fi degradarea glucozei până la dioxid de carbon şi apă) este ridicată, atunci este necesar ca ea să decurgă în etape (Figura 14) pentru a asigura protecţia celulei şi eficienţa

transformării. Fiecare etapă este caracterizată de o anume energie de activare.

În decursul proceselor metabolice din celulă se produce nu numai eliberare de energie din moleculele care o stochează dar şi acumulare de energie chimică prin reacţii în care starea energetică finală este un nivel energetic superior celui iniţial.

Declanşarea acestor procese endergonice se realizează pe baza *cuplajului* cu o reacţie exergonică, ceea ce face posibilă existenţa fenomenelor biologice antientropice (consumatoare de entropie, prin care se trece de la o stare cu entropie mare într-o stare cu entropie mai mică, contrar tendinţei de evoluţie a sistemelor fizice). Cuplajul presupune existenţa unui *intermediar* cu rol de produs de reacţie pentru unul din procesele cuplate şi cu rol de reactant pentru celălalt proces.

Aproape fiecare reacţie chimică dintr-o celulă este catalizată de o enzimă. Numărul reacţiilor enzimatice dintr-o celulă este foarte mare. De exemplu, într-o celulă animală există 1.000-4.000 de tipuri diferite de enzime (după J. Darnell, H. Lodish şi D. Baltimore, 1990) fiecare catalizând o singură reacţie sau un set de reacţii chimice. Anumite enzime se găsesc în majoritatea tipurilor de celule, deoarece catalizează reacţii celulare comune: sinteza proteinelor, a acizilor nucleici, a

fosfolipidelor, conversia glucozei şi oxigenului în dioxid de carbon şi apă, etc.

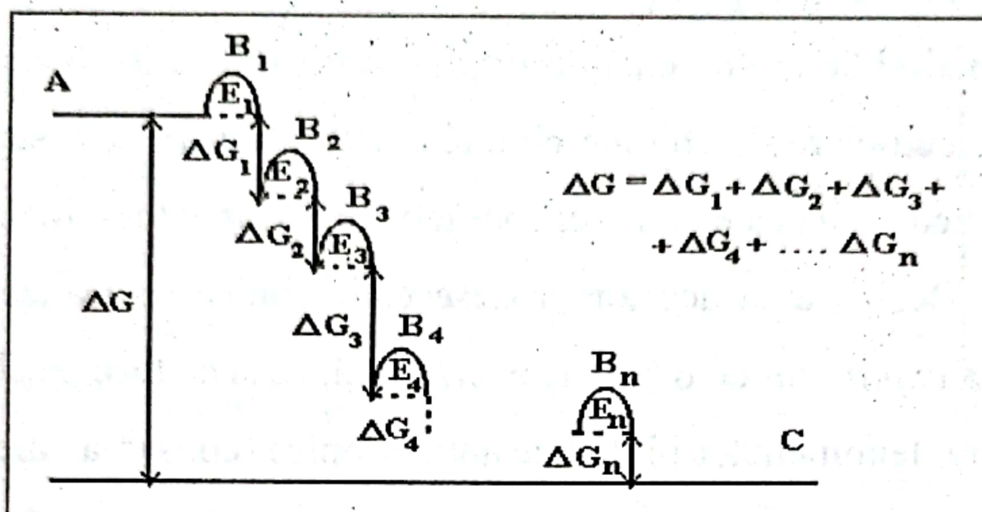


Figura 14. - Reacţie exergonică derulată în etape, fiecare stare energetică intermediară fiind caracterizată de o energie de activare (modificat după M. Isac 1987)

3.4. Proprietăţile structurale şi de mediatori ai reacţiilor autoimune

Componentele glicoproteice, dar şi cele glicolipidice (menţionate în capitolul anterior), fac obiectul unei largi patologii autoimune (demielinizări mediate imunitar).

Implicarea proteinelor fibrilare citoscheletice (microtubuli, microfilamente şi neurofilamente) în structurarea formei şi integrităţii fibrelor nervoase, fac obiectul a numeroase studii.

Microtubulii, ca polimeri de tubulină sunt implicaţi în transportul axonal anterograd rapid, iar microfilamentele ca elemente de încastrare a constituenţilor membranari sunt de fapt polimeri de actină, ataşaţi membranar prin intermediul unor proteine submembranare (spectrină , ankirină, vinculină) sau transmembranare din familia integrinelor.

Proteinele transmembranare sunt asociate structurilor joncţionale celulare "strânse" sau a celor de "ancorare". Proteinele transmembranare din familia receptorilor de suprafaţă din grupul integrinelor intervin în acroşarea membranelor din reţeaua actină – spectrină. O astfel de configuraţie permite legarea, pe de o parte a citoscheletului la proteinele membranare (canale ionice, pompele Na^+/K^+, molecule de adeziune de tipul alfa –actininei şi vinculinei, etc.) şi pe de altă parte, la interacţiunea filamentelor de actină cu proteinele matricei extracelulare de tipul colagenului de tip IV, laminina, proteoglicanul heparan sulfat - perlecanul, entactina, fibrina etc. (Cruce M. and all.,1997)

La nivelul joncţiunilor de aderenţă (intercelulare sau de tip celula – matrice) s-au identificat proteine care aparţin moleculelor de adeziune calciu dependente intercelulare (caderine) sau intracelulară (alfa, beta, gamma–catenine,

vinculina, alfa–actinină şi plakoglobulina – (Isac C.M. and all.,1999) .

În plus, reţeaua de actină - spectrină din membrana axolemică, formează o structură elastică deformabilă temporar constituind un sistem de protecţie a fibrelor nervoase faţă de diverse solicitări mecanice (întinderi sau compresiile produse de mişcarea membrelor).

Structura mielinei compacte este dictată de o arhitectură proteică complexă, bogată în proteine (P_0, P_1, P_2, PMP $_{22}$, etc.) a căror organizare şi rol este încă incomplet elucidată, mai ales în patologia nervoasă .

Proteina P_0 este o glicoproteină transmembranară reprezentând 50% din proteinele mielinei şi se pare că are un rol esenţial în structurarea şi stabilitatea mielinei conectă la straturile infra – şi extracelulare.

Proteina P_1 (MBP) sau proteina bazică a mielinei, deşi este o componentă în concentraţie redusă (2 - 16%) este implicată în conectarea straturilor intracelulare la cele mielinice.

Proteina P_2 prezentă într-o concentraţie de 1 – 15 %, pare să aibă un rol predominant metabolic şi mai puţin structural.

Proteina P_{22} (PMP-22) sau proteina mielinei periferice, se găseşte într-o concentraţie de 2 – 5 % din totalul proteinelor mielinice şi ar putea juca un rol ca moleculă de adeziune între celula Schwann şi axon, dar şi în reglarea multiplicării celulare.

În mielina noncompactă au fost identificate cîteva proteine ca *glicoproteina asociată mielinei* **(MAG)** cu rol de adeziune în compactarea mielinei şi în declanşarea unor neuropatii demielinizante autoimune prin anticorpi anti - MAG.

Conexina $_{32}$ din regiunea paranodală şi incizurile Schmidt – Lanterman ar juca un rol important în mielinizarea normală şi schimburile axon – celulă Schwann, precum şi în formarea joncţiunilor comunicante (gap) celulare mielinice.

De obicei, denumirea enzimei indică funcţia sa: sufixul *-ază* - este adăugat denumirii tipului de moleculă asupra căreia acţionează enzima. Astfel, proteazele degradează proteinele, fosfatazele înlătură reziduurile fosfat, ribonucleazele clivează moleculelelde ARN (acid ribonucleic).

Există şi enzime care se pot găsi numai într-un anumit tip de celulă, deoarece catalizează anumite tipuri de reacţii specifice (de exemplu, cea neuronală).

Modul de acţiune al enzimelor, specificitatea, competitivitatea şi caracterul de saturaţie al interacţiunilor enzimă - substrat pot fi cunoscute din cursurile de biochimie şi

enzimologie, ceea ce vom aduce noi în atenţia cititorului în cele ce urmează, fiind doar un punct de vedere cantitativ asupra cineticii reacţiilor enzimatice, respectiv relaţia Michaelis-Menten.

CAPITOLUL 4

Proteinele contractile

Un aspect deosebit de interesant în biofizica moleculară şi celulară îl reprezintă *mobilitatea celulară* şi *contractilitatea*, a căror suporturi generatoare de forţă sunt reprezentate de o întreagă gamă de structuri infracelulare, de natură proteică, grupate în două sisteme moleculare: **actină, miozină** şi **dineină, tubulină**. Astfel de structuri intră în componenţa citoscheletului sub formă de microfilamente de actină, microtubi şi centrioli.

În raport cu tipul şi interacţiunea diverselor proteine contractile asistăm la producerea unei largi game de fenomene motrice de la mişcarea amoeboidală, flagelară sau ciliară, până la cele de endo – şi exocitoză, migrarea cromozomilor la

nivelul fusului de diviziune sau a scurtării dimensiunilor citotisulare în cursul contracţiei musculaturii striate sau netede.

În celulele musculaturii striate (fibrele striate) se găsesc miofibrilele, organite intracelulare specifice alcătuite dintr-o succesiune de unităţi contractile numite *sarcomere.*

Sarcomerul conţine proteine contractile structurate reprezentate de ***miozină*** (filamente groase, cu diametrul de 110 Å - Figurile 15 şi 16) şi ***actină*** (filamente subţiri, cu diametrul de 50 Å), precum şi proteine reglatoare de tipul ***tropomiozinei şi troponinei*** care la muşchiul neted este reprezentată de ***calmodulină.***

Moleculele de miozină sunt formate din două elemente înfăşurate în spirală şi care se termină cu un cap globular. Miozina are forma unei baghete bifurcată la unul din capete, cu o lungime totală de 15 - 19 nm, o greutate moleculară de 480.000 Da şi o structură formată din şase lanţuri din care două **lanţuri grele (MHC), de meromiozină grea,** la care se ataşează câte două lanţuri de **meromiozină uşoare (MLC).**

Miozina prezintă capacitatea de a hidroliza molecula de ATP până la ADP şi fosfat (P), precum şi de a lega actina, la nivelul extremităţilor bifurcaţiei.

Extremitatea activă enzimatică este denumită în literatura de specialitate segmentul $\mathbf{S_1}$ (greutatea moleculară de

120.000 Da) continuată cu segmentul S_2 (greutatea moleculară 60.000 Da), ce împreună formează aşa numita ***meromiozină grea***. Restul moleculei (formă fibrilară) reprezintă ***meromiozina uşoară*** (greutatea moleculară de 150.000 Da) (Figura 15).

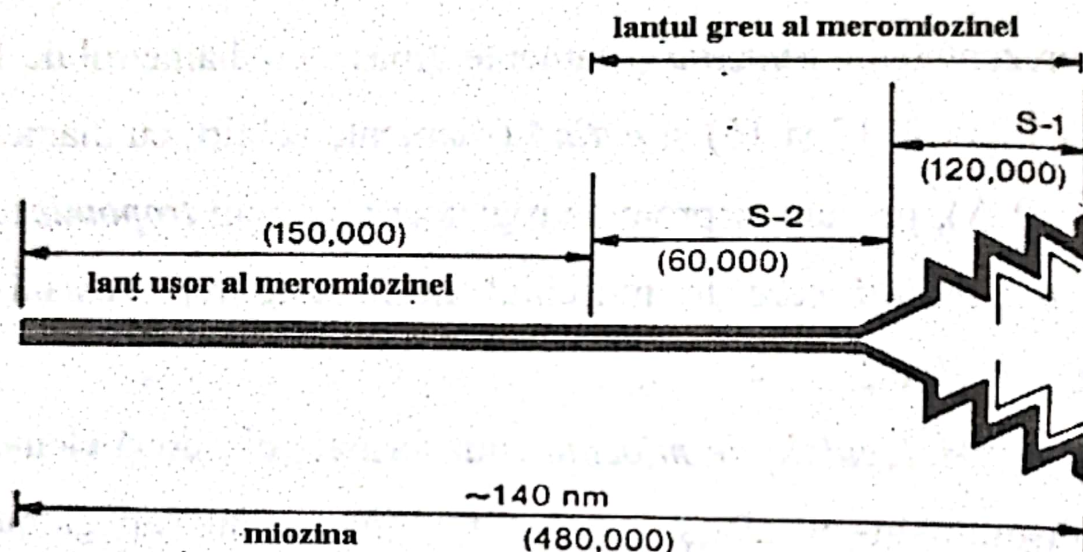


Figura 15. - Structura miozinei: lanţul greu (segmente laterale S1 şi S2) şi uşor de meromiozină. (după W. Hope şi col. 1983)

Filamentul gros, de miozină este alcătuit din circa 400 molecule de miozină care îşi "împletesc" împreună porţiunile fibrilare nebifurcate, în timp ce segmentele S1 rămân în poziţii excentrice, disponibile pentru cuplarea filamentelor subţiri în timpul contracţiei (Figura 16).

Actina constituie 60 % din masa filamentelor subţiri şi este formată prin polimerizarea unor monomeri globulari - **G**

actina (Figura 17). Monomerul stabil numai în apă distilată, polimerizarea declanşându-se la creşterea concentraţiei ionice , când se constituie două lanţuri dublu spiralate - **F actina**, cu pasul elicei de 72 nm. Restul compoziţiei filamentelor subţiri

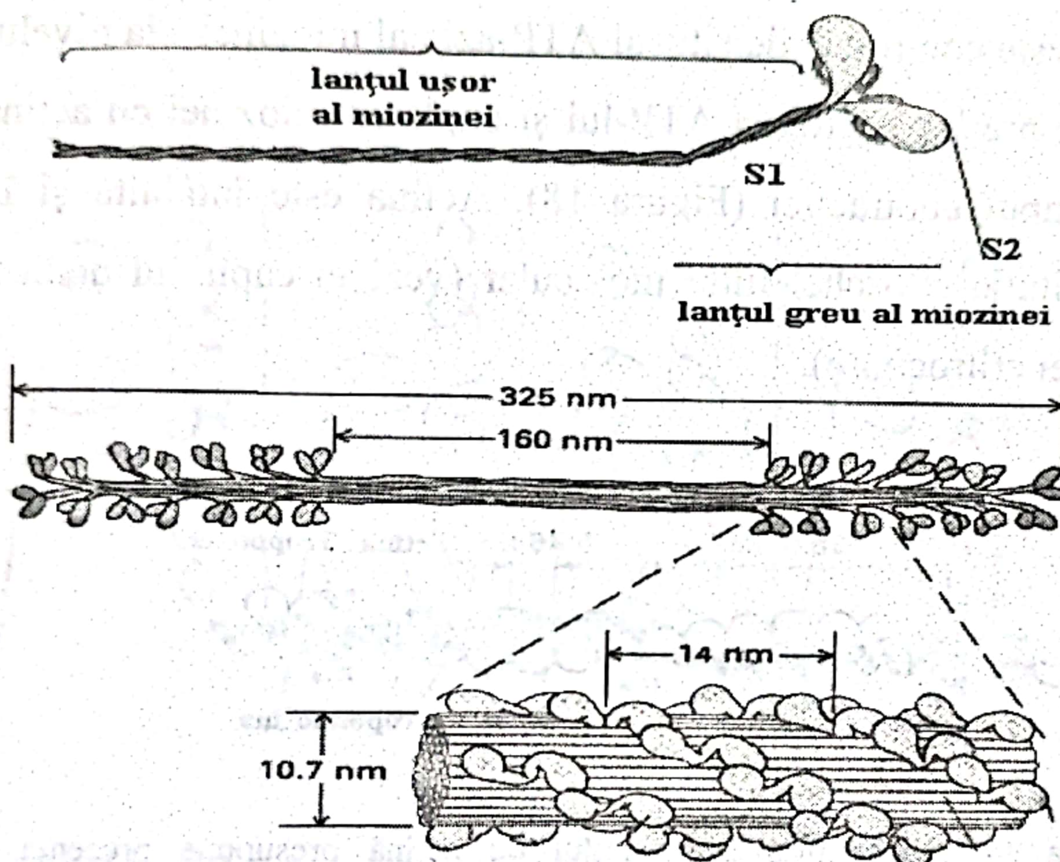


Figura 16. - Structura filamentului de miozină (după J. Darnell şi col. 1990)

este reprezentat de ***tropomiozina*** **şi** ***troponina***,cu rol de proteine reglatoare.

Tropomiozina însoţeşte lanţurile de actină, ca un lanţ spiralat paralel, iar troponina cu mare afinitate pentru calciu este ataşată tropomiozinei la fiecare 38 nm lungime. Complexul

tropomiozină - troponină are rol reglator al contracţiei, în fibra musculară striată, în timp ce în fibra musculară netedă, rolul troponinei este suplinit de calmodulină .

Transformarea moleculei de ADP (prin fosforilare) în ATP este controlată de situsul ATP-azic al miozinei - la nivelul căruia are loc hidroliza ATP-lui şi cuplarea miozinei cu actina în timpul contracţiei (Figura 18). Actina este întâlnită şi în constituţia citoscheletului molecular (vezi în capitolul dedicat celulei eritrocitare).

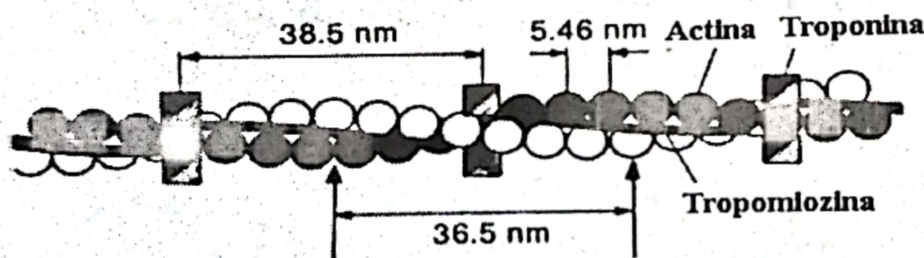


Figura 17. - Structura filamentului de actină presupune prezenţa şi interacţiunea actinei cu troponina şi tropomiozina (W. Hope şi col. 1983)

După cum se va vedea în capitolul dedicat structurii citotisulare musculare, contracţia constă din scurtarea lungimii sarcomerilor (Figura 18), prin alunecarea filamentelor subţiri printre filamentele groase (conform modelului filamentelor glisante al lui Huxley, 1957). Singura modificare conformaţională în timpul contracţiei, fiind cea corespunzătoare

unghiului dintre segmentul S1 şi segmentul S2 al actinei, (conform modelului lui Huxley si Simmon, 1971),(M. Isac şi R. M. Isac 1983, 1985, 1986, 1987, 1988, 1990, 1991, 1992; I. Haulică şi F. Topoliceanu, 1989)

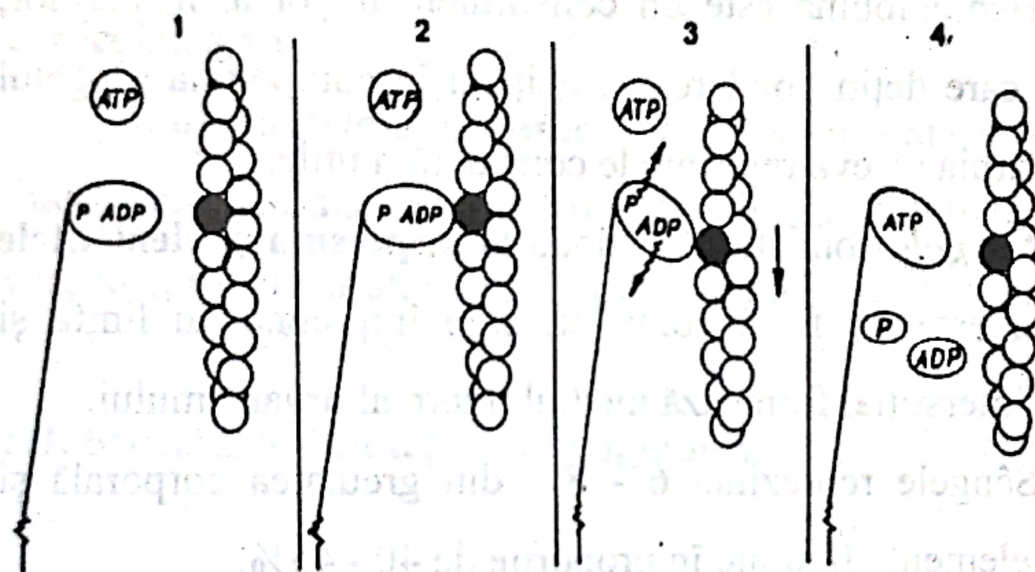


Figura 18. (1) - Formarea complexului actomiozinic presupune transformări ale sistemului ADP – ATP; (2) - Cuplarea miozinei cu actina; (3) - Modificarea cu circa 45° a unghiului dintre segmentele S1 şi S2, concomitent cu scindarea ATP - ului în ADP şi fosfat (sub controlul situsului ATP - azic al segmentului S2); (4) - Decuplarea presupune intervenţia altei molecule de ATP (J. Darnell 1990)

CAPITOLUL 5

Elemente de biofizica hemoglobinei

Hemoglobina este un constituient major al hematiilor, celulele care deţin ponderea principală în compoziţia sângelui asupra căruia câteva referinţe le considerăm utile.

Sângele constituit din două faze, **plasma şi elementele figurate**, este un fluid complex, care împreună cu limfa şi lichidul interstiţial formează mediul intern al organismului.

Sângele reprezintă 6 - 8% din greutatea corporală şi conţine elemente figurate în proporţie de 40 - 45%.

Principalele **elemente figurate** sunt:

- *eritrocitele* (99%)
- *leucocitele* (celulele albe)
  - ✓ granulocite (65%);
  - ✓ limfocite (30%);
  - ✓ monocite (5%);
- *plachete* (trombocite).

Plasma sangvină este alcătuită din 90% apă şi 10% reziduuri uscate, din care 9% substanţe organice şi 1% substanţe anorganice).

Substanţele organice sunt: proteine (albumina, globulinele, fibrinogenul ş.a.), lipide (colesterol, fosfolipide, ş.a.), glucide (glucoza, ş.a.), acizi organici (acid lactic, acid citric, ş.a.), pigmenţi serici (bilirubina, urobilinogenul, ş.a.), enzime (amilaza, lipaza, fosfataza alcalina, ş.a.), vitamine (A, D, E, PP, B_1, B_2, B_6, B_{12}, C, ş.a.) şi hormoni (estrogeni, corticoizi, ş.a.).

Substanţele anorganice sunt: sodiul, potasiul, calciul, magneziul, fierul, cuprul, zincul, manganul, clorul, acidul carbonic, ionul sulfat, bromul, iodul, fluorul, etc.

5.1. Structura şi funcţiile hemoglobinei

În situaţiile fiziologice normale **hemoglobina,** prezentă în citoplasma celulelor roşii ale sângelui (eritrocite - hematii) reprezintă o treime din greutatea celulei. La fiecare 194 de zile toată cantitatea de hemoglobină se reînnoieşte, fiind sintetizată la nivelul măduvei osoase şi în ficat (în organismul adult, rolul ficatului este mult mai puţin important decât pentru embrion). În procesul de hemoliză, hemoglobina este degradată până la bilirubină, care se excretă în căile biliare şi se elimină din organism sub formă de stercobilinogen şi urobilinogen.

Comparativ cu alte componente ale sângelui, greutatea moleculară, mărimea şi forma moleculei de hemoglobină pot fi urmărite în Tabelul 5 şi Figura 19.

Tabelul 5. Greutăţile moleculare şi dimensiunile maxime ale hemoglobinei şi ale altor biomolecule (modificat, după F. Gremy şi J. Perrin, 1975)

Molecula	**Greutatea moleculară (da)**	**Dimensiunea maximă (angstrom)**
Uree	60	4
Hemoglobină	68.000	42
ADN	10.000.000	10.000.000 (1 micron)

Hemoglobina este din punct de vedere chimic o cromoproteină, cu o greutate moleculară de 64.500 Da, formată din patru lanţuri polipeptidice, fiecare din acestea conţinând un component de tip pigment denumit ***hem***. Fiecare din cele patru grupe ale hemului sunt protoporfirine cu ioni bivalenţi de fier plasaţi central. Fiecare structură protoporfirinică se compune la rândul ei, din patru inele pirolice legate prin punţi metinice. Componenta proteică este formată din patru lanţuri polipeptidice individuale care conţin mai mult de 140 resturi de aminoacizi.

Arhitectura spaţială a acestei molecule a fost deja elucidată într-o mare măsură prin analiza tridimensinală de difracţie cu raze X.

Hemoglobinele izolate de la diferite specii de animale conţin *globine* diferite (partea proteică), dar aceeaşi grupare prostetică - ***hemul.***

Structura hemoglobinei, asemănătoare cu a clorofilei, se bazează pe un nucleu porfirinic, tetrapirolic, centrat pe un atom de fier(hemul), la care se leagă partea proteică, globina, care poate să difere de la o specie la alta (Figura 20).

Globina se ataşează la atomul de fier din centrul hemului, aproximativ perpendicular pe planul hemului de o parte, iar de cealaltă parte legându-se oxigenul, dioxidul de carbon, etc. Nucleul porfirinic conţine 20 de atomi de carbon şi 4 atomi de azot; la hemoglobină (hemoglobină, oxihemoglobină, carboxihemoglobină, etc.) în centrul nucleului molecular profirinic este legat un atom de fier; iar la moleculele de clorofilă (clorofila **a**, clorofila **b**, clorofila **c**) în centrul acestui nucleu este plasat un atom de magneziu iar în cazul vitaminei B_{12} (cian - cobalamina) se află un atom de cobalt, după cum au confirmat studiile bazate pe difracţia razelor X.

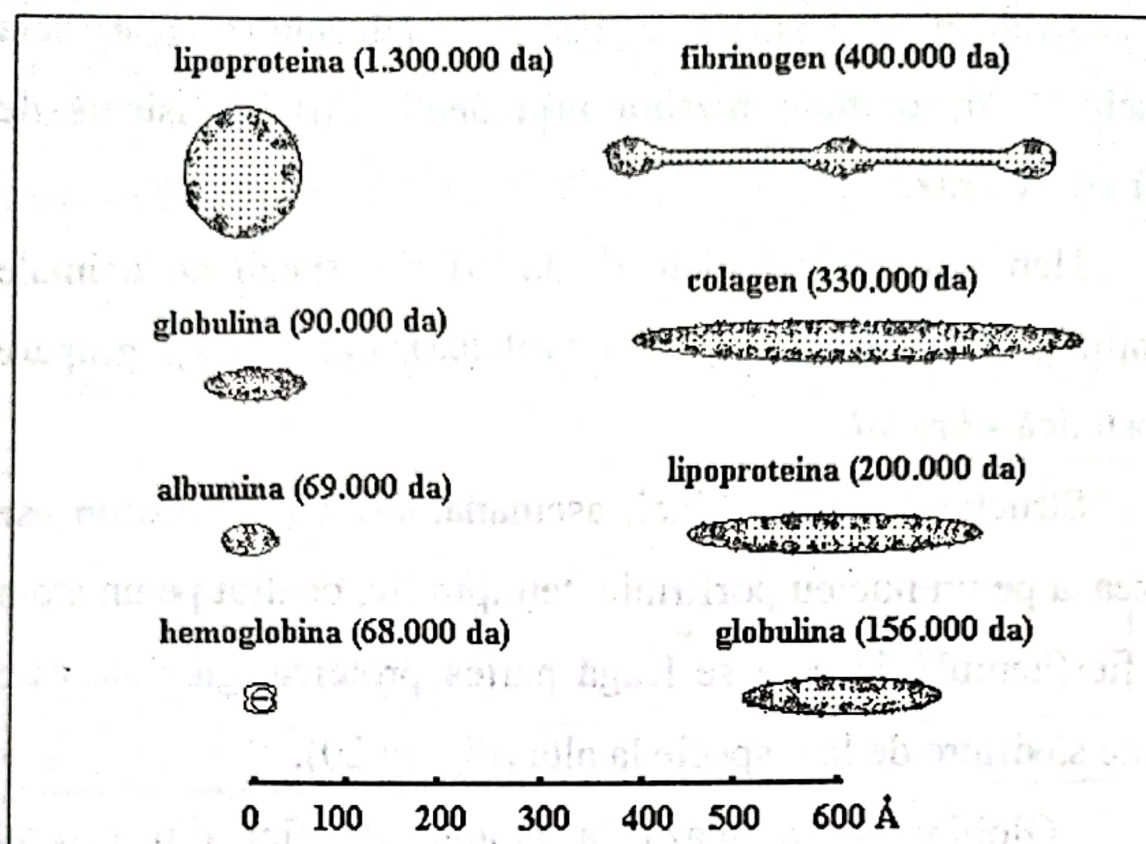


Figura 19. - Greutăţi moleculare şi dimensiuni maxime ale hemoglobinei şi ale altor biomolecule (modificat după F. Gremy şi J. Perrin 1975)

O altă reflectare a structurilor similare ale hemoglobinei şi clorofilei (deşi aceasta din urmă nu este o proteină) este dată de asemănările proprietăţilor optice ale produşilor lor de degradare, respectiv hematoporfirina şi etioporfirina.

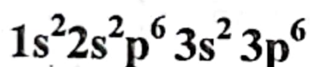
Caracterul feromagnetic al atomului de fier favorizează observarea fenomenului Mossbauer (absorbţia şi emisia rezonantă a radiaţiilor gamma) fapt ce a constituit obiectul a numeroase studii efectuate în anii 1970 - 1980 de May, Lang şi Marshall, atât pe hemoglobină cât şi pe citocromi (structura de

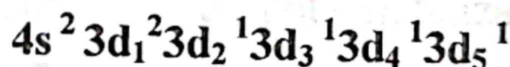
hem fiind prezentă şi în unele enzime ale lanţului respirator din mitocondrii, cum sunt citocromii).

Caracteristicile spectrului Mossbauer sunt sensibile la legăturile interatomice pe care le realizează fierul şi pot da informaţii despre structurile electronice şi de ligand din jurul atomului de fier (Figura 21).

Atomul de fier din centrul hemului este hexacoordinat, patru dintre valenţele sale de coordinaţie fiind satisfăcute de cele patru inele pirolice, a cincea putând lega o moleculă de apă iar a şasea - o moleculă de gaz (oxigen, dioxid de carbon).

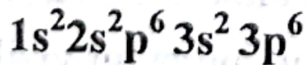
Proprietăţile feromagnetice ale hemului sunt rezultatul configuraţiei electronice a fierului din compoziţia sa. Fierul atomic are următoarea configuraţie electronică:

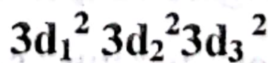




18 electroni pe straturile interne 8 electroni periferici

În schimb, fierul dublu ionizat are configuraţia:





Aceasta înseamnă că îi rămân trei orbitali electronici **4p** liberi pe ultimul strat, împreună cu doi orbitali **3d** şi cu un orbital **4s**.

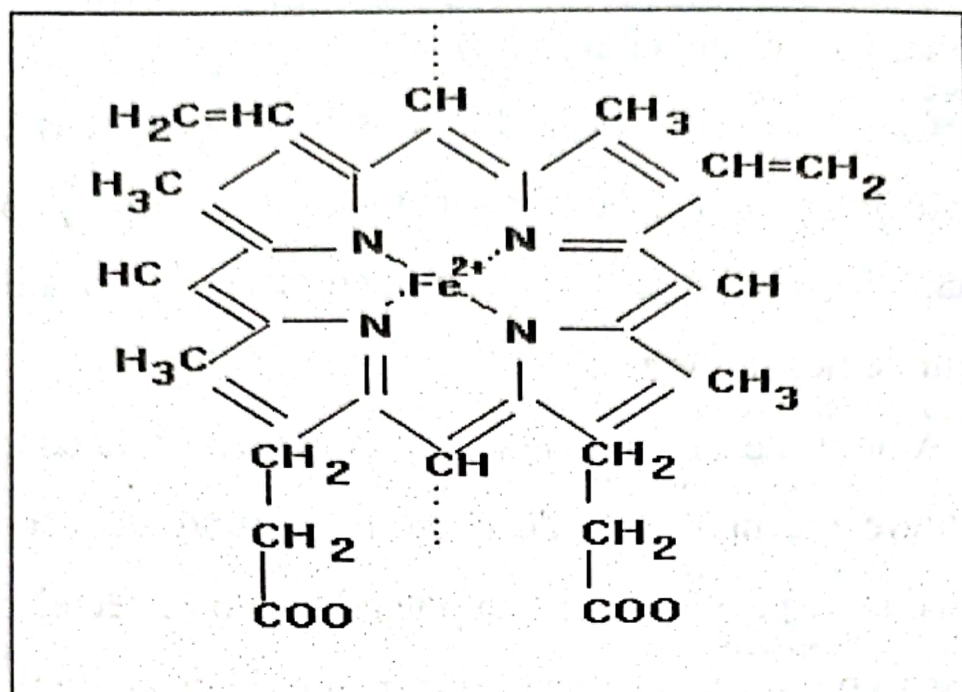


Figura 20. - Structura hemului cu atomul de fier dublu ionizat în centrul planului, având patru din cele şase valenţe satisfăcute de atomii de azot din cele patru inele pirolice şi cu două valenţe libere pentru cuplarea globinei şi a unui ligand (după Schmidt 1989)

Fiecare din aceştia poate fi ocupat cu câte doi electroni pe care fierul îi acceptă de la alţi atomi sau grupe de atomi, deci valenţa fierului atomizat este egală cu şase şi se realizează cu participarea a 12 electroni de la atomii învecinaţi cu fierul.

Hemoglobina poate fi analizată spectral (Figura 21) în mod direct, cu aparatura spectrală pentru domeniul vizibil (care este mai accesibilă decât cea pentru ultraviolet, care necesită fibră optică din cuarţ): spectroscoape sau spectrofotometre cu echipament pentru vizibil, căci hemul absoarbe în spectrul

vizibil, în domeniul verde - gălbui (complementar domeniului roşu pe care îl reemite).

Alte cromoproteide cu funcţii respiratorii şi cu structură porfirinică (conţinând de asemenea, fier) sunt citocromii, catalazele, peroxidazele, ş.a., iar neporfirinice sunt, de exemplu, enzimele flavinice şi hemocianinele din organismul melcilor şi moluştelor (conţinând cupru).

Cromoproteide fără funcţie respiratorie sunt clorofilele, ficocianinele şi ficoeritrinele din algele roşii şi albastre (cu structură porfirinică) şi carotenproteidele ca purpurul retinian, rodopsina, ş.a., (fără structură porfirinică).

Hematiile mature nu au capacitátea de a sintetiza hemoglobină şi-au pierdut mitocondriile şi ARN -ul, spre deosebire de hematiile foarte tinere care pot sintetiza hemoglobina din precursorii proteici ai globinei concomitent captării fierului prin intermediul unei proteine de legătură (o proteină specifică, transferina sau siderofilina, care transportă fierul prin membrana hematiilor imature).

În mod normal, legarea moleculelor de oxigen, monoxid de carbon, dioxid de carbon, la atomul de fier trebuie să confere o stabilitatea suficientă noului compus pentru a putea fi

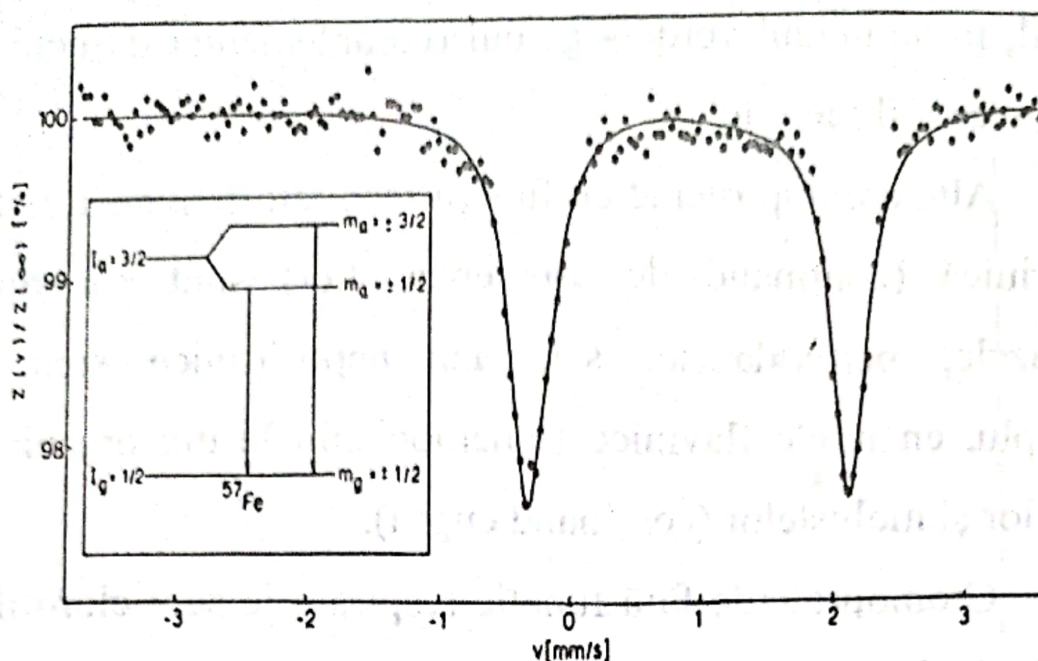


Figura 21. - Spectrul Mossbauer al dezoxihemoglobinei umane prezintă două picuri ca urmare a despicării nivelului energetic caracterizat de numărul cuantic nuclear I_a=3/2 datorită existenţei unui moment magnetic de cuadrupol al atomului de fier (două valori ale numărului cuantic magnetic m_a=3/2 şi m_a=1/2 desemnează cele două subnivele energetice ale nivelului caracterizat de I_a=3/2) (după W. Hope şi col. 1983)

transportat de la un ţesut la altul iar, pe de altă parte, legătura trebuie să aibă un caracter reversibil pentru ca după atingerea punctului terminal al transportului, moleculele ligand să se poată elibera de hemoglobină.

Hemoglobinopatiile sunt afecţiuni legate de existenţa hemoglobinelor anormale, cu oxigenul legat prea puternic sau prea slab la atomul de fier. Este cazul anemiei falciforme (V. Rusu şi C. Brănişteanu, 1987) când, din cauza insuficienţei oxigenului, hemoglobina din hematii precipită şi hematia se deformează luând aspect de seceră. Consecinţa este creşterea

rigidităţii şi scăderea deformabilităţii la trecerea prin capilare ceea ce duce la distrugerea membranelor eritrocitare (hemoliză) şi în final, scăderea cantităţii de hemoglobină care înseamnă anemie.

Tehnicile spectrale bazate pe difracţia razelor X au evidenţiat în cazul anemiilor falciforme o concentraţie sporită de ioni de calciu acumulat în hematiile modificate.

În cazul ***corpilor Heinz*** avem de-a face cu precipitarea hemoglobinei denaturate sub formă de corpusculi, la pacienţi trataţi anterior cu mari cantităţi de antioxidanţi (sulfamide, antimalarice, etc.) care au perturbat fixarea oxigenului. Aceste precipitate se ataşează de membrana hematiei şi îi sporesc rigiditatea, astfel că la trecerea prin structura sinuoasă arterială splinică, hematia este reţinută şi scoasă din circuitul sangvin înainte de împlinirea duratei normale de viaţă. Reducerea numărului de hematii determină apariţia anemiei cu manifestări severe uneori.

Studii asupra conductibilităţii electrice a hemoglobinei au evidenţiat caracterul de semiconductor al acestei molecule, curbele de variaţie cu inversul temperaturii, al logaritmului rezistenţei electrice, prezentându-se ca nişte drepte. În prezenţa adsorbanţilor conductibilitatea se modifică - creşte odată cu scăderea constanţei dielectrice (permitivităţii electrice) a

adsorbanților: H_2O, D_2O (apa deuterată), CH_3OH confirmând ipoteza efectului de impuritate al acestor molecule asupra semiconductorului pe care îl constituie hemoglobina.

De un interes deosebit pentru funcția respiratorie și rolul hemoglobinei în transportul gazelor respiratorii (O_2 și CO_2), sunt studiile și datele referitoare la capacitatea de fixare și disociere a acesteia, în condiții de efort hipo – și hiperbaric (F.Topoliceanu și col., 1972) și rolul de sistem tampon al acestuia în homeostazia bazică a mediului intern.

Aceste aspecte sunt dezvoltate și fac obiectul cercetărilor de biofizică, biochimie, fiziologie sistemică respiratorie ale efortului și recuperării funcționale cardio-respiratorii (Apostol Ion și col., G. Pandele și col.; Avram și F. Topoliceanu, 1995).

CAPITOLUL 6

Molecule macroergice

Moleculele macroergice din celulele organismelor vii au rolul de stocare a energiei provenită din procese metabolice de internalizare a energiei din exteriorul organismului (din degradarea alimentelor sau din fluxul energetic solar cum este cazul ATP la plantele autotrofe). Aceste tipuri de molecule au şi capacitatea de a elibera energia înmagazinată când procesele metabolice consumatoare de energie o cer.

În lumea vie se cunosc mai multe tipuri de compuşi macroergici (Tabelul 6), care înmagazinează energie chimică la nivelul unor legături interatomice cum sunt:

- legăturile hidrolizabile de tip P-O, care sunt şi cel mai des întâlnite, (legăturile P-O apar în cadrul grupărilor pirofosfat, acil-fosfat şi fosfofenol);
- legăturile hidrolizabile S-C, întâlnite mai rar, de exemplu în cadrul grupării tioester, prezentă la unul din metaboliţii cei mai importanţi - acetilcoenzima A.

- legăturile hidrolizabile P-N, destul de rare, prezente în molecula de fosfagen (sau fosfocreatina).

Cel mai caracteristic compus macroergic este acidul adenozintrifosforic - ATP care prin hidroliza unei grupări fosfat trece în ADP - acid adenozindifosforic.

Tabelul 6. Energiile ΔG degajate prin hidroliza unor compuşi cu fosfor (după M. Isac 1987)

Compus fosforilat	P - enolpiruvat	Glucozo-1-fosfat
ΔG(cal/mol)	12800	5000
Compus fosforilat	1,3-di-P-glicerat	Fructozo-6-fosfat
ΔG(cal/mol)	11800	3800
Compus fosforilat	P-creatină	Glucozo-6-fosfat
ΔG(cal/mol)	10500	3300
Compus fosforilat	Acetil - P	3-P-glicerat
ΔG(cal/mol)	10100	3100
Compus fosforilat	ATP	Glicerol-1-P
ΔG(cal/mol)	7000	2300

Molecula de ATP prezintă încărcare electrică (patru sarcini negative localizate pe legătura fosforică), toate cele

patru grupări fosfat fiind disociate în condiţiile pH-ului neutru (7,0) din citoplasma celulară.

Stabilitatea compusului macroergic ATP este dată şi de interacţiunile între două grupări fosfat negative monovalente cu un ion bivalent de calciu sau magneziu.

Din punct de vedere electrostatic măsura energiei stocate în această moleculă este dată de cea a energiei electrostatice a complexului de sarcini electrice negative, energie de respingere care este compensată la nivelul energiei interne a compusului stabilizat, în care cele patru sarcini sunt menţinute în apropiere una de alta (Figura 22).

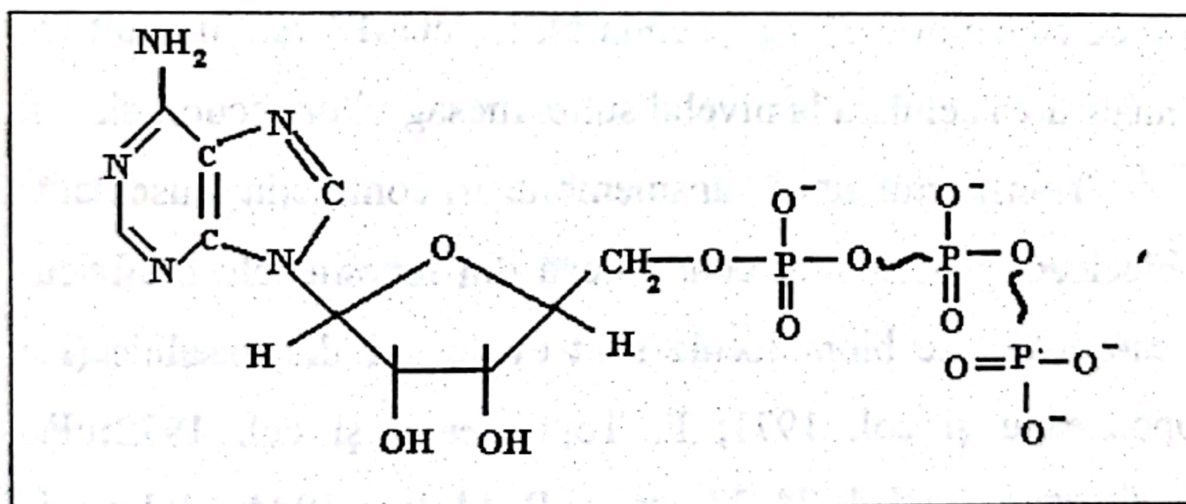


Figura 22. - Structura moleculei macroergice de ATP (acid adenozintrifosforic)

Reacţia reversibilă ATP⇔ADP joacă rolul unei baterii energetice celulare care se încarcă prin fosforilarea ADP şi se descarcă prin hidroliza ATP:



$$ATP^{4-} + H_2O \Leftrightarrow ADP^{3-} + HPO_4 + H^+$$

ATP este direct implicat în multe procese energetice din celulă, cum sunt: glicoliza, fosforilarea oxidativă, fotofosforilarea. Acesta este prezent în toate tipurile de celule animale şi vegetale din scara filogenetică. ATP se poate transforma în AMP ciclic (cAMP) având rol în semnalizarea şi deci în comunicarea celulară.

Guanozintrifosfatul (GTP) are un rol asemănător ATP-ului (de stocare de energie celulară), iar cGMP este întâlnit în semnalizarea celulară la nivelul suitei mesagerilor secundari.

Transportul activ transmembranar, contracţia musculară şi bioelectrogeneza sunt doar câteva din fenomenele biofizice în care astfel de biomolecule sunt evident, indispensabile (F. Topoliceanu şi col. 1971; F. Topoliceanu şi col. 1972; F. Topoliceanu şi col. 1974; M. Isac şi R. M. Isac 1984; M. Isac şi R. M. Isac 1985; M. Isac şi R. M. Isac 1988).

CAPITOLUL 7

Enzimele lanţului respirator

Majoritatea covârşitoare a celulelor sunt dotate cu *mitocondrii*, organite celulare care asigură conversia energiei în forme care pot fi utilizate pentru desfăşurarea reacţiilor chimice din celulă. La nivelul *membranei interne* mitocondriale există un procentaj semnificativ de proteine (circa 70%) cu *proprietăţi enzimatice*. Acestea sunt baza moleculară a proceselor de *transport de electroni* prin care se converteşte energia eliberată în reacţiile de oxido-reducere spre forme convenabile de stocare, mai ales în molecule macroergice de tip ATP (*fosforilarea oxidativă*). Tot la acest nivel este localizat un număr însemnat de enzime, care catalizează diverse alte reacţii celulare.

Enzimele lanţului respirator cum mai sunt denumite proteinele implicate direct în reacţiile de *oxido - reducere* - mai ales a glucidelor şi acizilor graşi, asigură degradarea totală a piruvatului şi acizilor graşi, în prezenţa oxigenului, până la bioxid de carbon şi apă.

În lipsa acestora, energia provenită din degradarea glicolitică (cum se întâmplă, de exemplu în celulele eritrocitare adulte şi în celulele maligne) este caracterizată de un randament mult mai coborât: numai 2 molecule de ATP se pot sintetiza pentru fiecare moleculă de glucoză şi nu 36, ca în cazul fosforilărilor oxidative.

Preocupări ale biofizicienilor ieşeni pentru investigaţii experimentale asupra unor procese bioenergetice din organismele animale, s-au axat pe modificări enzimatice induse de unele substanţe toxice administrate şobolanilor de laborator (R. M. Isac şi M. Isac, 1982) ca şi pe acţiunea unor câmpuri magnetice asupra fosforilărilor oxidative din creierul acestor organisme (P. Jitariu şi M. Isac 1968).

În mod analog, la nivelul proteinelor din *membranele cloroplastelor* (organite celulare specifice plantelor verzi) se realizează conversia energiei, iniţial cea electromagnetică din spectrul vizibil al radiaţiei solare, apoi cea din degradarea glucidelor şi acizilor graşi, în formele utilizabile pentru desfăşurarea celorlalte reacţii celulare.

Avem de-a face cu un cuplaj chemo - osmotic, în cadrul căruia *donori de electroni* bogaţi în energie (rezultată din degradarea alimentelor, sau utilizarea radiaţiei solare), o transferă treptat unui lanţ de molecule transportoare de

electroni, având ca rezultat *pomparea protonilor* din interior spre exteriorul membranei interne (în matrix) şi generarea unui *gradient electrochimic transmembranar* de protoni (Figura 23). (Într-unul din capitolele următoare se va vedea că un astfel de gradient, presupune o componentă chimică - diferenţă de concentraţie, precum şi o componentă electrică - diferenţă de potenţial electric). În baza acestei energii sunt catalizate o serie de reacţii controlate de către enzimele membranare.

La mitocondrii şi cloroplaste o parte semnificativă din energia internă din celulă este destinată fosforilării ADP-ului până la ATP (sub controlul unei ATP - sintetaze). Aceste aspecte bioenergetice se întâlnesc atât la eucariote cât şi la procariote.

Procariotele sunt prevăzute cu membrane bogate în proteine enzimatice şi internalizează energia eliberată din oxidarea substanţelor hrănitoare luate din mediul extern stocând-o însă în mod preferenţial, în gradientul de potenţial electrochimic protonic, convertită ulterior, între altele şi pentru *locomoţia* în mediul ambiental.

Mecanismul fosforilării oxidative (Figura 24) este susţinut de *trei complexe enzimatice* (trei ansamble de proteine respiratorii - Figura 25).

Cel mai remarcabil colector de electroni de mare energie proveniţi din degradarea oxidativă a alimentelor este NADH. Fiecare astfel de moleculă captează câte un ion negativ de hidrogen, adică un atom neutru de hidrogen la care se ataşează un electron. Într-o primă etapă a transportului de electroni, NADH revine la forma de NAD^+ prin eliberarea unui proton şi a doi electroni.

NADH - dehidrogenaza este principalul component al primului şi celui mai mare complex enzimatic al lanţului respirator. Electronii eliberaţi de el, trec la un centru flavinic de dezenergizare şi apoi sunt dirijaţi către cinci centre cu fier şi sulf spre o moleculă mică de ubiquinonă (sau CoA) unde pierd treptat, alte diferite cantităţi din energie iniţială. Această moleculă este de mici dimensiuni şi are mare mobilitate în membrană.

În *al doilea complex enzimatic* respirator (complexul de citocromi *b*-c_1), electronii eliberaţi de ubiquinonă trec la citocromul *c* din dimerul *b*-c_1 (fiecare monomer conţine trei grupări de tipul hemului legate la citocromi şi o proteină cu fier şi sulf). Citocromul *c* este o proteină mică din planul periferic al membranei.

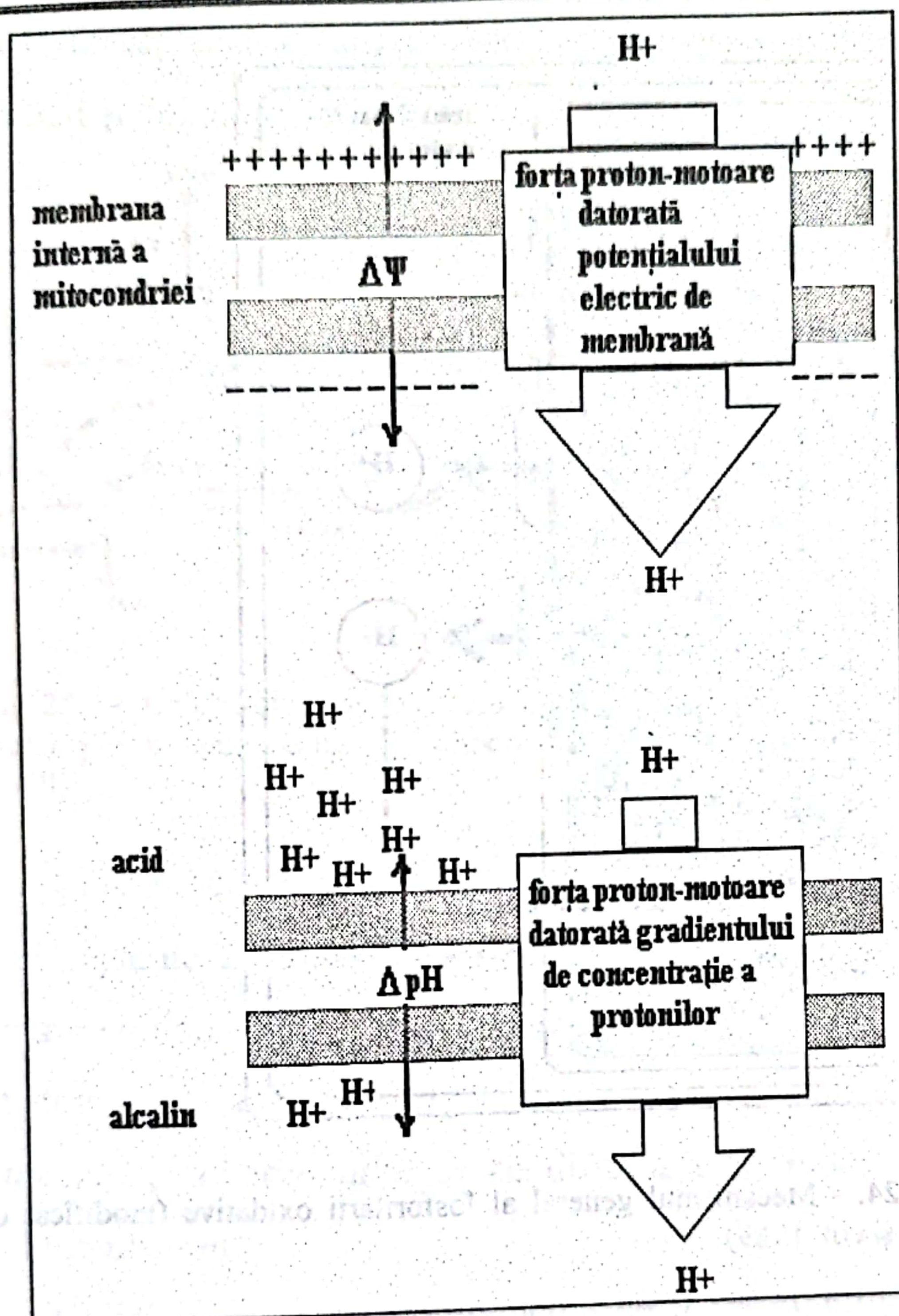


Figura 23. - Cele două componente ale gradientului electrochimic protonic (după Alberts şi col. 1989)

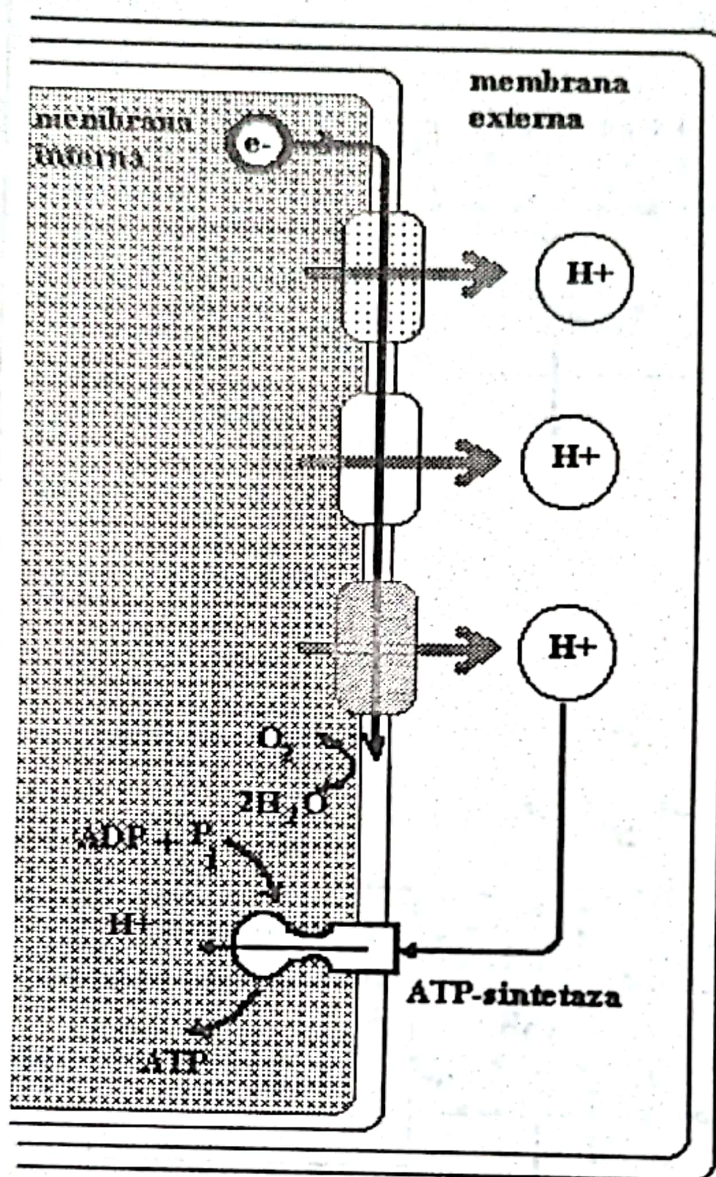


Figura 24. - Mecanismul general al fosforilării oxidative (modificat după Alberts şi col. 1989)

În *al treilea complex enzimatic* – (Figura 25) complexul citocrom-oxidativ - bazat pe citocromi *aa₃*, electronii eliberaţi de citocromul *c* sunt dirijaţi, în final, spre oxigen. Acest complex enzimatic este şi cel mai bine cunoscut. El se prezintă

ca un dimer, fiecare din cei doi monomeri conţinând doi citocromi şi doi atomi de cupru.

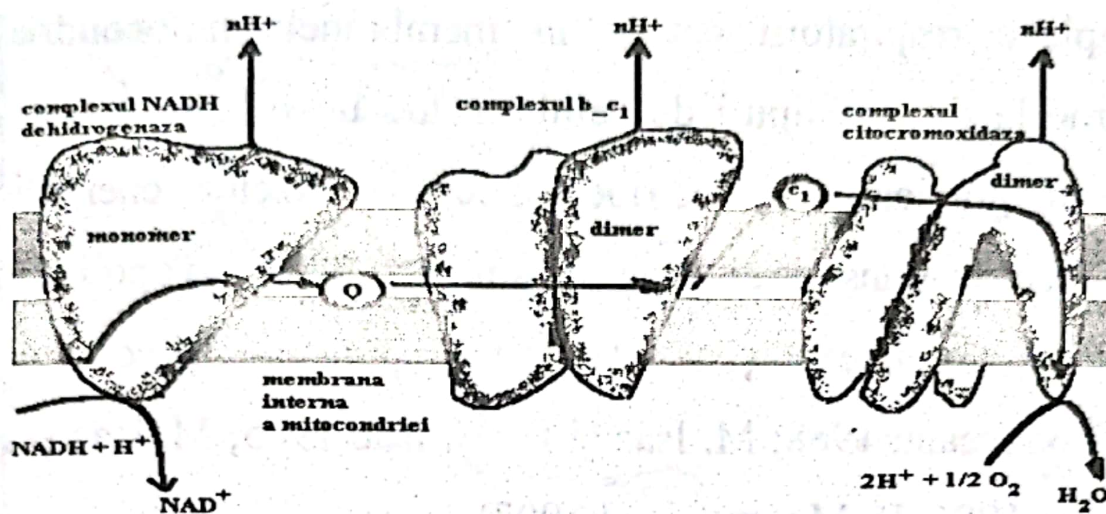


Figura 25. - Cele trei complexe enzimatice constituente ale lanţului respirator: *Q* = ubiquinona iar c_1 = citocromul c_1 (modificat după Alberts şi col. 1989)

Cele trei complexe enzimatice pot fi considerate ca nişte entităţi separate ale membranei interne fără a li se atribui o structurare ordonată care să explice transportul electronilor căci acest transport se poate explica prin marea mobilitate a *ubiquinonei* şi *citocromului* c_1 ce difuzează cu rapiditate în planul membranei.

Coliziunile acestor componente de mare mobilitate cu componentele adiacente din complexele enzimatice ale lanţului respirator pot explica vitezele mari cu care sunt transportaţi electronii (la fiecare 5-20 milisecunde un electron este trecut de la un complex enzimatic la următorul).

Investigaţiile cantitative au arătat că enzimele lanţului respirator sunt prezente în proporţii diferite atât, în cele trei complexe respiratorii cât şi în membranele mitocondriale interne la diferite tipuri de celule având un rol privilegiat în geneza gradientelor electriochimice şi surselor energetice implicate în transportul activ transmembranar (F. Topoliceanu 1974; F. Topoliceanu şi col. 1977; F. Topoliceanu şi col. 1984; F. Topoliceanu 1988; M. Isac şi R. M. Isac 1985; M. Isac şi R. M. Isac 1986; R. M. Isac şi col.1997).

Astfel, în celulele musculaturii cardiace (B. Alberts şi col. 1990), la fiecare moleculă de NADH dehidrogenază corespund trei molecule de complex b-c_1, şapte molecule de citocromoxidază, nouă molecule de citocrom c_1 şi 50 molecule de ubiquinonă.

Direcţia prestabilită pentru transportul electronilor în lungul lanţului de transportori este determinată de creşterea potenţialului redox dinspre NADH către oxigen - cele două extremităţi ale lanţului respirator (Figura 26). Potenţialul redox este o măsură a afinităţii pentru electroni a fiecărei perechi conjugate redox: cum este NADH cu NAD^+ sau H_2O şi 1/2 O_2 şi care se poate evalua practic - în principiu - utilizând o pereche de electrozi imersaţi în soluţiile ce conţin componentele unei perechi redox.

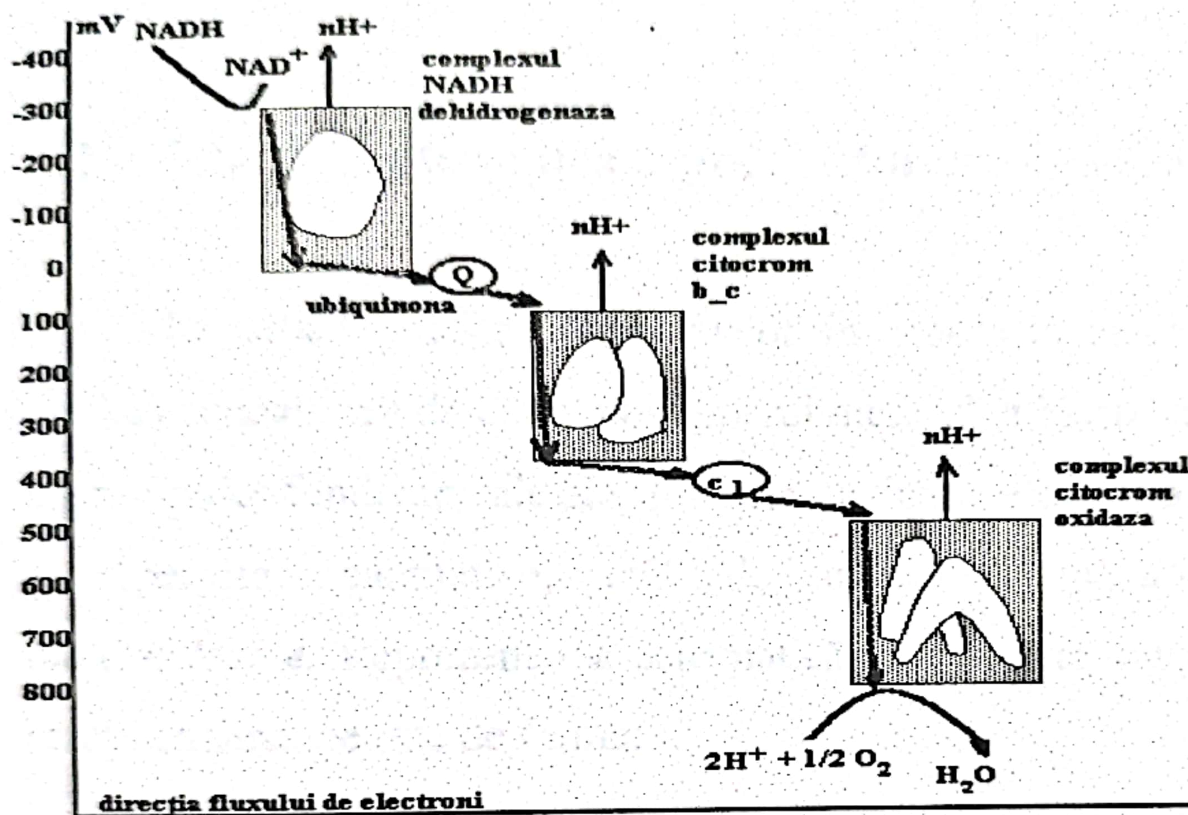
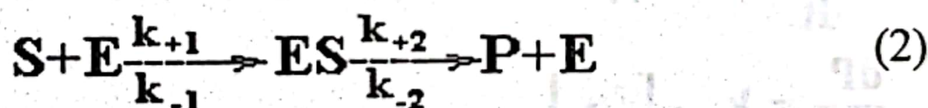


Figura 26. - Variaţia potenţialului redox (mV) în lungul lanţului respirator. Ubiquinona este notată cu *Q* iar citocromul c_1 cu c_1 (Alberts şi col., 1989).

CAPITOLUL 8

Modelarea matematică a proceselor enzimatice

Importanţa majoră a enzimelor în procesele celulare implică cunoaşterea de către bioinginerul medical şi biofizician a principiilor fundamentale ale reacţiilor enzimatice şi mai ales a aspectelor cantitative, atât de utile în *aplicaţiile biotehnologice*. Reprezentarea schematică a celei mai simple reacţii enzimatice este de forma:



$$S+E \underset{k_{-1}}{\overset{k_{+1}}{\rightleftharpoons}} ES \underset{k_{-2}}{\overset{k_{+2}}{\rightleftharpoons}} P+E \qquad (2)$$

unde: prin **E** şi **S** se notează enzima şi substratul, iar prin **ES** şi **P** se notează complexul enzimă - substrat şi produsul de reacţie. Constantele de viteză pentru prima şi cea de-a doua fază a reacţiei se notează cu **k**, primind semnul plus pentru sensul direct al reacţiei şi semnul minus pentru sensul invers.

De regulă, constanta de viteză a reconversiei produsului final în complex enzimă - substrat este foarte mică, practic

neglijabilă. Considerându-se neglijabili gradienţii de concentraţie din reactor (concentraţie constantă în toate zonele bioreactorului) şi notându-se valorile iniţiale cu S_0, E_0, $(ES)_0=0$ şi $P_0=0$ se pot scrie ecuaţiile diferenţiale care oferă imaginea cantitativă a transformărilor suferite de enzimă şi substrat. Forma generală a ecuaţiilor este:

$$\frac{dx_i}{dt} = f_i(x_1,\dots,x_n) \tag{3}$$

ceea ce conduce la sistemul de mai jos.

$$\begin{aligned}
\frac{dS}{dt} &= -k_{+1}SE + k_{-1}[ES] + \gamma \\
\frac{dE}{dt} &= -k_{+1}SE + k_{-1}[ES] + k_{+2}[ES] \\
\frac{d[ES]}{dt} &= k_{+1}SE - k_{-1}[ES] - k_{+2}[ES] \\
\frac{dP}{dt} &= k_{+2}[ES]
\end{aligned} \tag{4}$$

Constantele de viteză **k** asigură şi omogenizarea dimensională.

Dacă prin **S** se desemnează cantitatea de substrat din reactor, cu **ν** se notează fluxul de substrat care intră în reactor şi care, are aceleaşi dimensiuni ca şi $\frac{dS}{dt}$ şi se exprimă în moli/litru - secundă în condiţiile în care **S**, **E** şi **ES** se exprimă în moli/litru.

Se observă că prin sumarea celei de-a doua şi celei de-a treia din ecuaţiile de mai sus se obţine condiţia de conservare a cantităţii de enzimă din reactor, adică atât cantitatea de enzimă cuplată cu substratul cât şi cantitatea de enzimă liberă:

$$\frac{d(E+[ES])}{dt}=0 \Leftrightarrow E+[ES]=const.=E_0 \qquad (5)$$

Rezultă că se poate înlocui **E+[ES]** şi cu $\mathbf{E_0}$ precum şi **E** cu $\mathbf{E_0}$.

Din sistemul de mai sus rezultă:

$$\begin{aligned}\frac{dS}{dt}&=-k_{+1}S(E_0-[ES]+k_{-1}[ES]+\gamma\\ \frac{d[ES]}{dt}&=k_{+1}SE_0-[ES](k_{-1}+k_{+2}+k_{+1}S)\end{aligned} \qquad (6)$$

Sistemul se poate adimensionaliza prin intermediul valorilor de referinţă ale concentraţiei de substrat şi respectiv de complex enzimă-substrat, alese ca fiind valorile de echilibru adică cele pentru care valorile vitezelor de variaţie respective se anulează.

$$\begin{aligned}\frac{dS}{dt}&=0\Rightarrow \overline{S}=constant\\ \frac{d[ES]}{dt}&=0\Rightarrow [\overline{ES}]=constant\end{aligned} \qquad (7)$$

Sistemul de ecuaţii diferenţiale de la care am pornit conduce astfel la:

$$
\begin{aligned}
&-k_{+1}\overline{S}\left[E_0-\left[\overline{ES}\right]\right]+k_{-1}\left[\overline{ES}\right]+\gamma=0\\
&k_{+1}\overline{S}E_0-\left[\overline{ES}\right]\left(k_{-1}+k_{+2}+k_{+1}\overline{S}\right)=0\ .
\end{aligned}
\qquad (8)
$$

De aici se pot determina valorile de echilibru ale concentraţiilor de complex enzimă-substrat şi respectiv substrat.

Din prima ecuaţie rezultă valoarea de echilibru pentru concentraţia de complex enzimă-substrat:

$$
\left[\overline{ES}\right]=\frac{k_{+1}\overline{S}E_0}{k_{-1}+k_{+2}+k_{+1}\overline{S}} \qquad (9)
$$

Apoi se obţine concentraţia de echilibru a substratului:

$$
\frac{k_{+1}\overline{S}E_0-\gamma}{k_{+1}\overline{S}+k_{-1}}=\frac{k_{+1}\overline{S}E_0}{k_{-1}+k_{+2}+k_{+1}\overline{S}}\Leftrightarrow\overline{S}=\frac{\gamma\left(k_{-1}-k_{+2}\right)}{k_{+1}\left[k_{+2}E_0-\gamma\right]} \qquad (10)
$$

Se introduce $\mathbf{k_m}$:

$$k_m = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} \tag{11}$$

Astfel că se poate scrie:

$$\overline{S} = \frac{\gamma k_m}{k_{+2}E_0 - \gamma}$$
$$\overline{ES} = \frac{k_{+1}E_0\overline{S}}{k_{-1} + k_{+2} + k_{+1}\overline{S}} \tag{12}$$

Înlocuind prima relaţie în cea de-a doua rezultă şi expresia de echilibru a lui **[ES]** :

$$\overline{ES} = \frac{\gamma}{k_{+2}}$$
$$\overline{S} = \frac{\gamma k_m}{k_{+2}E_0 - \gamma} \tag{13}$$

Pentru $\overline{S} > 0 \Rightarrow k_{+2}E_0 > \gamma$

Noile variabile adimensionale se definesc astfel:

$$x_1 = \frac{ES}{\overline{E}\,\overline{S}}$$
$$x_2 = \frac{S}{\overline{S}} \qquad (14)$$

În apropierea stării stabile aceste variabile adimensionale tind către valoarea unitară, iar noul sistem se poate scrie sub următoarea formă, care scoate în evidenţă noile variabile:

$$\frac{dx_2}{dt} = -k_{+1}x_2E_0 + k_{+1}x_2\frac{ES}{\overline{ES}} + \frac{k_{-1}}{\overline{S}}\frac{ES}{\overline{ES}}\overline{ES} + \frac{\gamma}{\overline{S}} \qquad (15)$$

$$\frac{dx_1}{dt} = k_{+1}\frac{E_0}{\overline{ES}}\frac{S}{\overline{S}}\overline{S} - x_1\left(k_{-1} + k_{+2} + k_{+1}\frac{S}{\overline{S}}\overline{S}\right) \qquad (16)$$

adică:

$$\frac{dx_1}{dt} = k_{+1}E_0x_2\frac{\overline{S}}{\overline{ES}} - x_1\left(k_{-1} + k_{+2} + k_{+1}x_2\overline{S}\right)$$
$$\frac{dx_2}{dt} = -k_{+1}x_2E_0 + k_{+1}x_2x_1\overline{ES} + k_{-1}x_1\frac{\overline{ES}}{\overline{S}} + \frac{\gamma}{\overline{S}} \qquad (17)$$

şi deci:

$$\frac{dx_1}{dt} = k_{+1}\overline{S}\left[\frac{E_0x_2}{\overline{ES}} - \frac{x_1}{\overline{S}k_{+1}}\left(k_{-1} + k_{+2} + x_2\overline{S}k_{+1}\right)\right] \qquad (18)$$

$$\frac{dx_2}{dt} = k_{+1}\overline{ES}\left[-\frac{E_0 x_2}{\overline{ES}} + x_1 x_2 + \frac{k_{-1}}{k_{+1}}\frac{x_1}{\overline{S}} + \frac{\gamma}{\overline{ES}k_{+1}}\right] \tag{19}$$

Pentru generalizare se introduc notaţiile:

$$\begin{aligned} &\frac{E_0}{\overline{ES}} = a = \frac{E_0}{\gamma}k_{+2} \\ &T_1 = \frac{1}{k_{+1}\overline{S}}, T_2 = \frac{1}{k_{+1}\overline{ES}} \end{aligned} \tag{20}$$

Prima ecuaţie din sistem se transformă astfel ca să se pună în evidenţă atât noile variabile cât şi parametrul $\mathbf{k_m}$:

$$\frac{dx_1}{dt} = \frac{1}{T_1}\left[ax_2 - \frac{x_1}{k_{+1}\overline{S}}(k_{-1} + k_{+2}) - x_1 x_2\right] = \frac{1}{T_1}\left[ax_2 - x_1\left(\frac{k_m}{\overline{S}} + x_2\right)\right] \tag{21}$$

Înlocuind expresia lui $\overline{S}$ şi folosind notaţiile introduse mai sus avem:

$$\frac{dx_1}{dt} = \frac{1}{T_1}\left[ax_2 - x_1\left(\frac{a\gamma - \gamma}{\gamma}\right) + x_2\right] = \frac{1}{T_1}\left[ax_2 - x_1(a - 1 + x_2)\right] \tag{22}$$

Din ecuaţia a doua, procedând în mod analog, se obţine:

$$\frac{dx_2}{dt} = \frac{1}{T_2}\left[-ax_2 + x_1x_2 + \frac{k_{-1}}{k_{+1}}\frac{x_1}{\overline{S}} + \frac{\gamma}{\overline{E}\,\overline{S}k_{+1}\overline{S}}\right] \quad (23)$$

Introducând notaţia:

$$b = \frac{k_{-1}(a - 1)}{k_{-1} + k_{+2}} \quad (24)$$

se ajunge la forma:

$$\frac{dx_2}{dt} = \frac{1}{T_2}\left[-x_2(a - x_1) + bx_1 + a - b + 1\right] \quad (25)$$

Se introduce raportul **ε** şi variabila adimensională **t′** :

$$\varepsilon = \frac{T_1}{T_2} \quad (26)$$

$$t' = \frac{t}{T_2} \quad (27)$$

astfel că sistemul de două ecuaţii diferenţiale ia forma:

$$\varepsilon \frac{dx_1}{dt'} = ax_2 - x_1(a - 1 + x_2)$$
$$\frac{dx_2}{dt'} = -x_2(a - x_1) + bx_1 + a - b - 1 \qquad (28)$$

În practică raportul ε este foarte mic, de ordinul lui 10^{-4}. Din prima ecuaţie se deduce:

$$ax_2 - x_1(a - 1 + x_2) = 0 \qquad (29)$$

$$x_1 = \frac{ax_2}{a - 1 + x_2} \qquad (30)$$

adică:

$$\frac{[ES]}{\overline{ES}} = \frac{a\frac{S}{\overline{S}}}{a - 1 + \frac{S}{\overline{S}}} = \frac{as}{(a-1)\overline{S} + S} \Leftrightarrow [ES] = \frac{aS\overline{ES}}{(a-1)\overline{S} + S} = \frac{E_0 S}{S + k_M} \qquad (31)$$

unde s-a introdus notaţia k_M - constanta lui Michaelis:

$$k_M = \left(\frac{E_0}{\overline{ES}} - 1\right)\overline{S} \tag{32}$$

De unde rezultă şi formula Michaelis - Menten:

$$\boxed{[ES] = \frac{E_0 S}{S + k_M}} \tag{33}$$

Reprezentarea grafică sugerată de figura de mai jos (Figura 27):

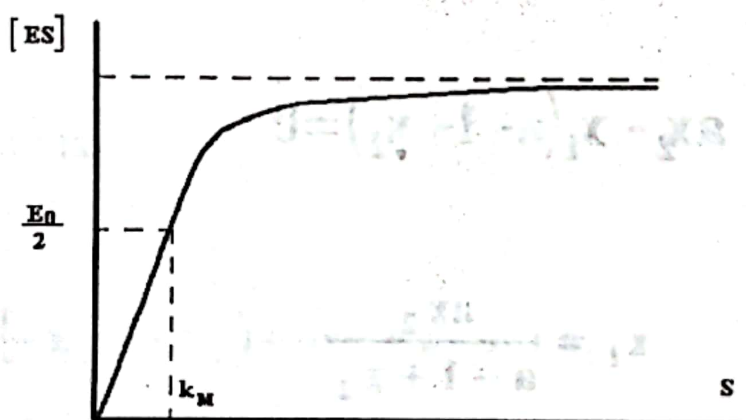


Figura 27. - Reprezentarea grafică a relaţiei cantitative ce descrie procesul enzimatic

Se observă că pentru o valoare a concentraţiei de complex enzimă - substrat egală cu jumătate din valoarea iniţială a concentraţiei de enzimă:

$$[ES] = \frac{E_0}{2} \quad (34)$$

unde: avem egalitate între constanta lui Michaelis şi concentraţia de substrat la echilibru:

$$k_M = \overline{S} \quad (35)$$

ceea ce dă şi semnificaţia constantei Michaelis.

Această constantă se dovedeşte a fi inversul constantei de echilibru a primei faze a procesului, cea de formare a complexului enzimă - substrat, dacă se admite că avem inegalitatea:

$$k_{+2} << k_{-1} \quad (36)$$

deci:

$$k_M = \frac{1}{k_1} = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} \quad (37)$$

Pentru determinări experimentale este foarte utilă forma inversă a relaţiei Michaelis - Menten:

$$\frac{1}{[ES]} = \frac{1}{E_0} + \frac{k_M}{E_0} \cdot \frac{1}{S} \quad (38)$$

Într-adevăr, trasând dreapta cea mai probabilă printre punctele date perechile de valori **S** şi **[ES]**, se poate determina E_0 din tăietura la ordonată şi k_M din panta dreptei; o estimare mai riguroasă este oferită de aplicarea metodei celor mai mici pătrate (Figura 28).

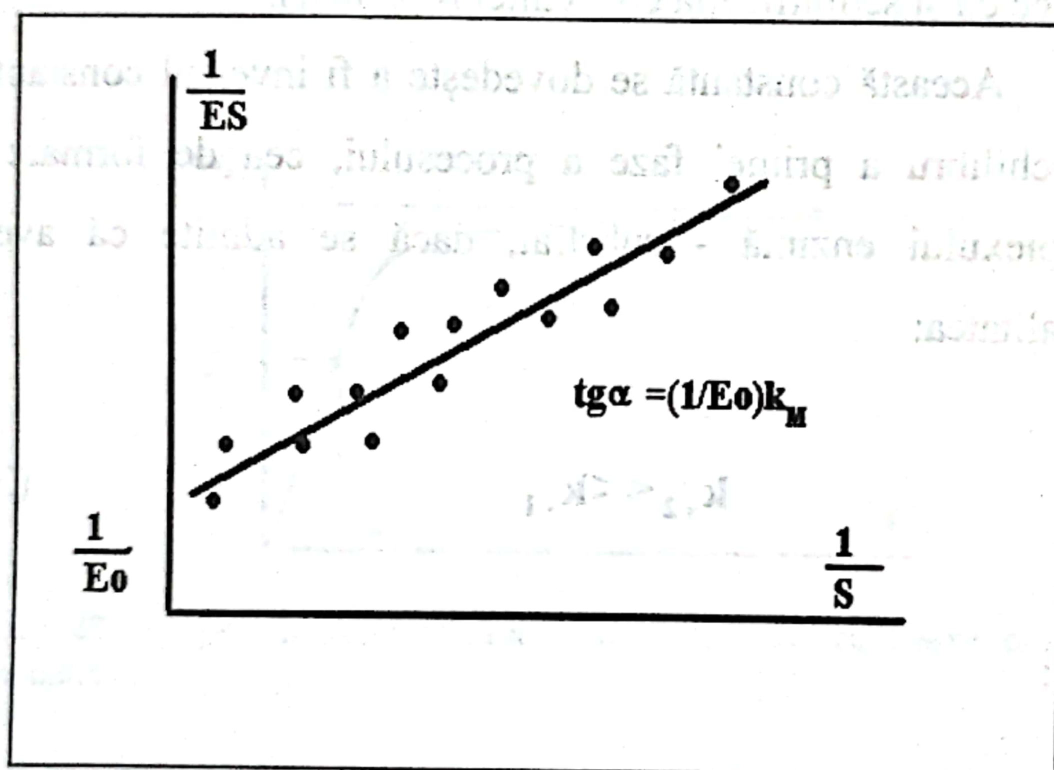
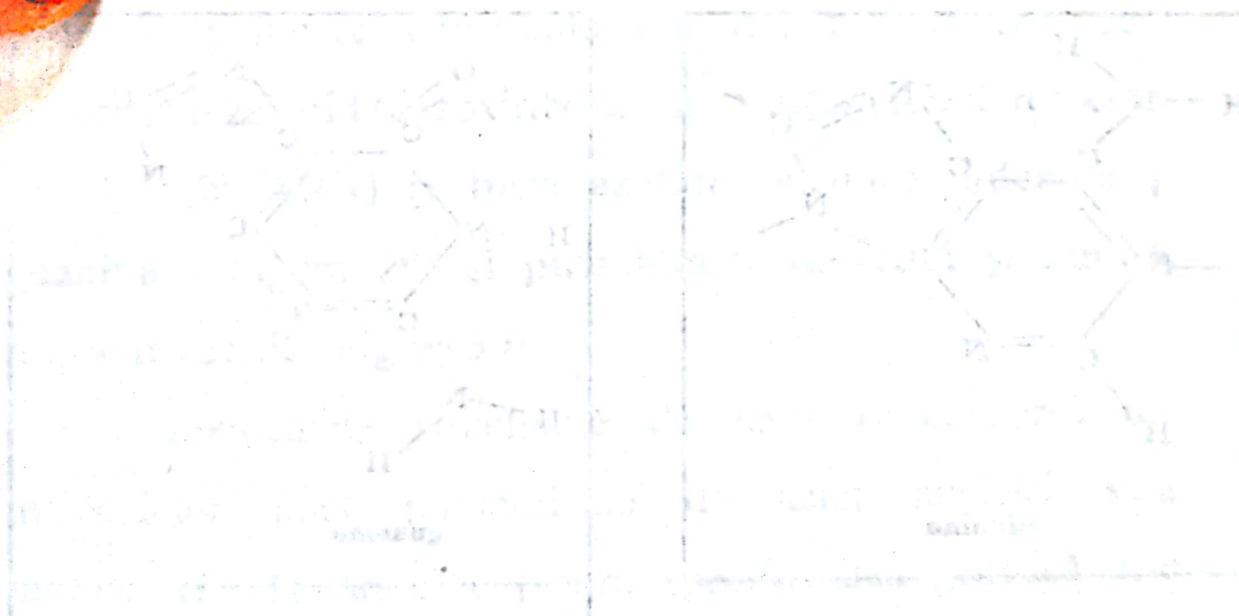


Figura 28. - Reprezentarea grafică a relaţiei Michaelis - Menten în formă liniară

În celulele organismului uman, obiectul de studiu esenţial al ştiinţelor medicale, ca şi în celulele

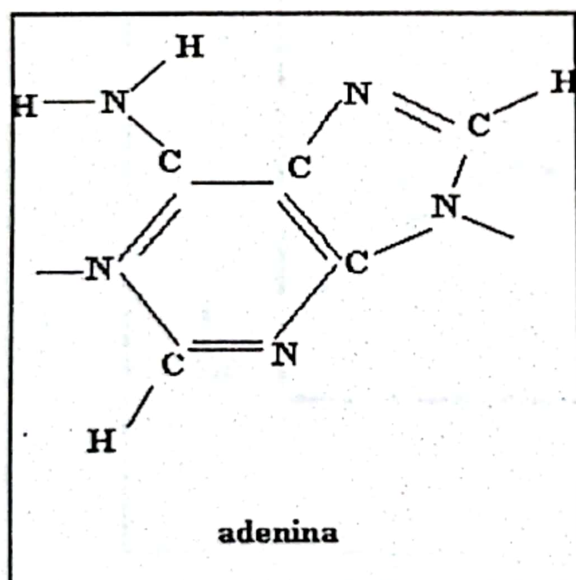
microorganismelor - materialul biologic principal în multe biotehnologii furnizoare de medicamente sau alimente, procesele enzimatice sunt adesea mult mai complexe şi necesită abordări matematice şi experimentale multiple.



CAPITOLUL 9

Acizii nucleici şi interacţiunile intermoleculare

Acizii nucleici (localizaţi în nucleul celular) - acidul dezoxiribonucleic – **ADN** şi acidul ribonucleic - **ARN** - sunt biopolimeri direct implicaţi în procesele de transmitere a informaţiei genetice caracteristice fiecărei specii.



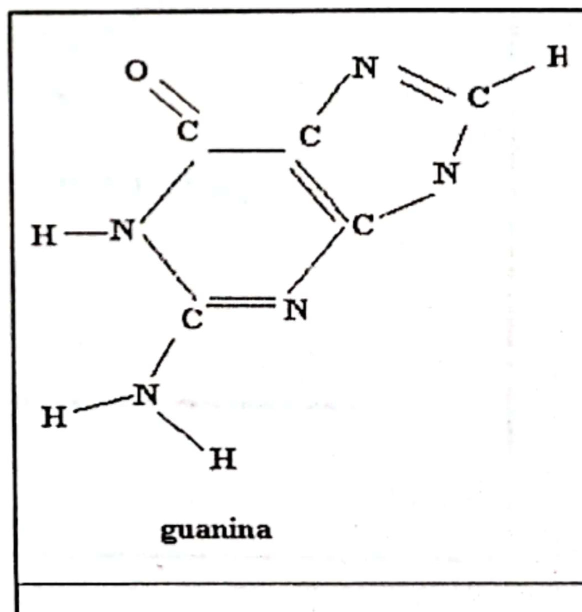


Figura 29. - Bazele purinice din compoziţia acidului nucleic **ADN**

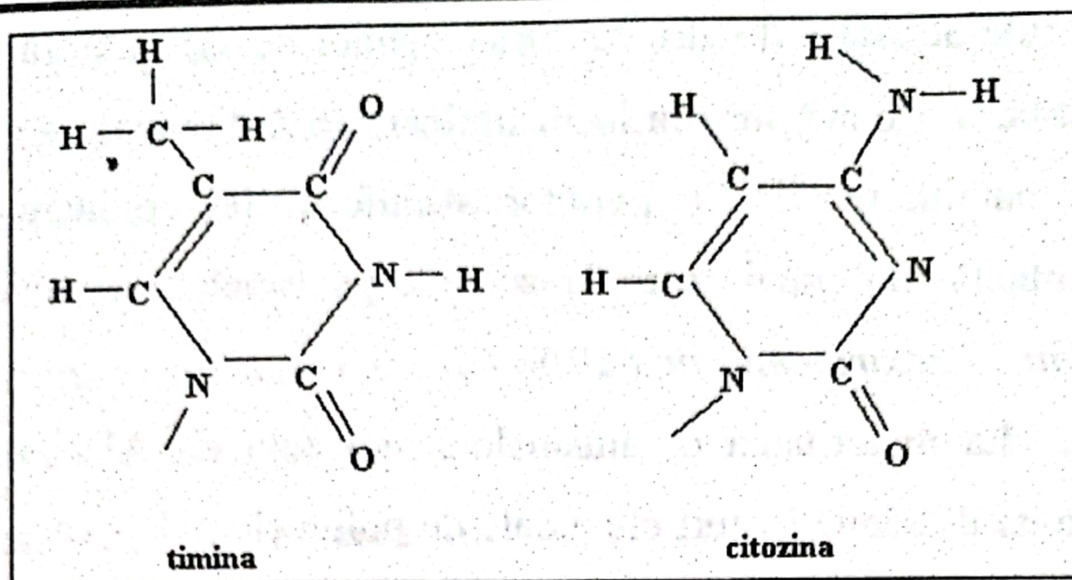


Figura 30. Bazele pirimidinice din compoziţia acidului nucleic **ADN**

Din punct de vedere chimic, acizii nucleici sunt molecule polimere constituite din trei componente: acid fosforic, un zaharid (dezoxiriboză – în structura **ADN**, respectiv riboză – în **ARN**) şi **baze azotate purinice (adenină şi guanină** - Figura 29) şi **pirimidinice (citozină şi timină,** respectiv **uracil** - Figura 30).

Elementele structurale de bază (monomerii) ale moleculelor înalt polimerizate de acizi nucleici sunt *nucleotidele*. Hotărâtoare pentru specificitatea genetică este ordinea bazelor în lanţul polinucleotidic.

*Acidul ribonucleic (***ARN***)* are funcţia de a depozita informaţia genetică. Acesta se caracterizează printr-un singur lanţ de nucleotide şi are dimensiuni mai mici în comparaţie cu

molecula de **ADN**. În structura moleculelor de **ARN** intră tot patru baze azotate, însă în locul timinei din **ADN** apare o altă bază numită uracil. Ca purtător al informaţiei ereditare, o importanţă mult mai mare la scara organismelor vii revine *acidului dezoxiribonucleic (ADN).*

La majoritatea organismelor, molecula de **ADN** este alcătuită din două lanţuri elicoidale de polinucleotide - ceea ce reprezintă structura primară (Figura 31 şi 32).

Aceste lanţuri sunt dispuse antiparalel şi legate unul de altul, la nivelul bazelor azotate, prin *punţi de hidrogen şi legături disulfurice* fiind răsucite în spirală - ceea ce reprezintă structura lor secundară.

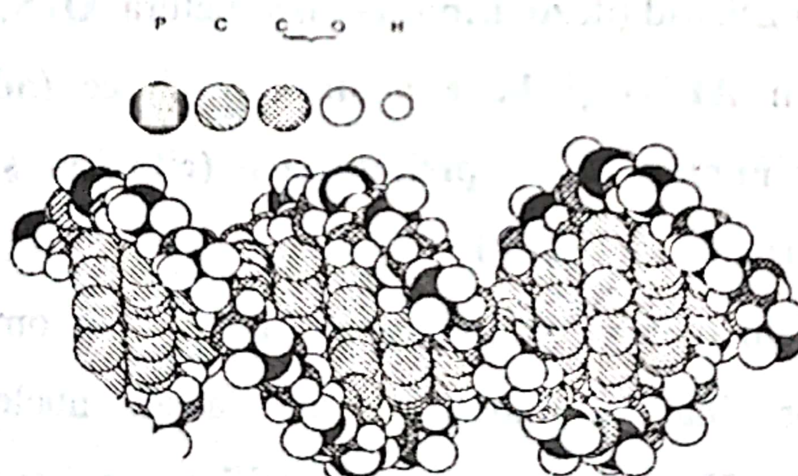


Figura 31. - Detaliu structural din molecula de acid dezoxiribonucleic. Sunt figuraţi distinct atomii de fosfor, carbon, oxigen şi hidrogen (J. Darnell şi col. 1990)

Legăturile de hidrogen se realizează numai între o bază purinică şi una pirimidinică,adică exclusiv între o citozină şi guanină, respectiv, între adenină şi timină.

Împerecherea bazelor complementare prezintă importanţă nu numai pentru structura intrinsecă a **ADN**, ci şi în procesele ereditare, prin faptul că favorizează replicarea identică şi transmiterea informaţiei. Ca şi la **ARN**, secvenţa bazelor reprezintă factorul determinant al specificităţii genetice a **ADN**.

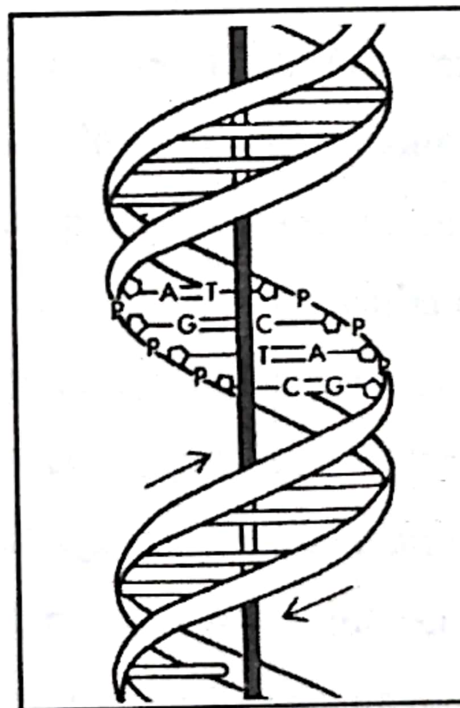


Figura 32. - Segment dintr-o moleculă ADN în care bazele complementare de pe cele două lanţuri vecine sunt (A - adenina şi T - timina sau C - citozina şi G - guanina) unite prin legături de hidrogen care pot fi rupte în urma energizărilor cauzate de absorbţia unor radiaţii. Pe o spiră de ADN există de regulă 10 perechi de baze (J. Darnell şi col. 1990)

Ca şi bazele azotate din constituţia lor şi la fel cu majoritatea covârşitoare a proteinelor, acizii nucleici absorb în domeniul ultraviolet al radiaţiei solare.

Expunerea la radiaţiile ultraviolete poate produce reorganizarea legăturilor de hidrogen la fel ca şi expunerea la

radiaţiile ionizante (efectele genetice ale radiaţiilor ultraviolete sunt comparabile cu cele ale radiaţiilor ionizante).

Radiobiologia şi genetica oferă mijloacele adecvate de investigare a transformărilor de care sunt susceptibile aceste biomolecule complexe din nucleul celular al eucariotelor sau din plasmidele procariotelor.



CAPITOLUL 10

Elemente de biofizica membranelor celulare

10.1. Structura membranei celulare

Din punct de vedere biochimic principalii constituienţi membranari sunt proteinele, lipidele şi colesterolul. Cele mai importante funcţii ale *proteinelor* sunt cele de permeabilizare şi cele enzimatice. Astfel, unele agregate proteice din membrane au rol în transportul ionilor şi moleculelor mici - este vorba de proteinele canal, canalele ionice şi pompele ionice care sunt alcătuite din subunităţi proteice intrinseci, capabile să străbată membrana de la o faţă la cealaltă. Alte agregate proteice au rol de receptori membranari pentru diferite tipuri de molecule mesager (hormoni sau neurotransmiţători care nu pot traversa membrana). Acestea se găsesc cel mai adesea la faţa externă a membranei - sunt proteine extrinseci.

Pompele ionice au şi funcţie enzimatică controlând reacţiile biochimice exergonice din care se eliberează energia necesară funcţiilor de transport activ pe care le îndeplinesc. Alte proteine enzimatice sunt cele de pe faţa internă a

membranei care au rol efector în raport cu informaţia receptată de la moleculele mesager captate la faţa externă a membranei.

Din punct de vedere electric, proteinele sunt adesea dipoli electrici semnificativi, cu atât mai mult cu cât au molecula mai alungită şi de dimensiuni mai mari. Proteinele care includ în constituţia lor resturi de molecule glucidice sau lipidice sunt cunoscute sub denumirea de *glicoproteine* şi *lipoproteine*.

Reamintim că *lipidele* sunt macromolecule formate dintr-un *"cap polar"* şi două lanţuri de acizi graşi, saturaţi sau nesaturaţi, care nu sunt polare, nu au caracterul dipolilor electrici. În constituţia biomembranelor, lipidele apar cel mai frecvent sub forma unui dublu strat lipidic, dar pot fi prezente şi sub forma unor micele sau agregate lipoproteice. Bistratul lipidic este cel mai răspândit, făcând parte din constituţia unui tip de membrană de larg consens reprezentat prin *modelul mozaicului fluid* (propus de Singer şi Nicholson - Figura 33). Capetele polare ale lipidelor din bistrat sunt orientate spre mediile apoase, polare din exteriorul şi respectiv interiorul celulei, în timp ce lanţurile nepolare sunt orientate unul spre celălalt, interacţionând prin legăturile hidrofobe care sunt principalele tipuri de interacţiuni ce asigură stabilitatea acestor structuri.

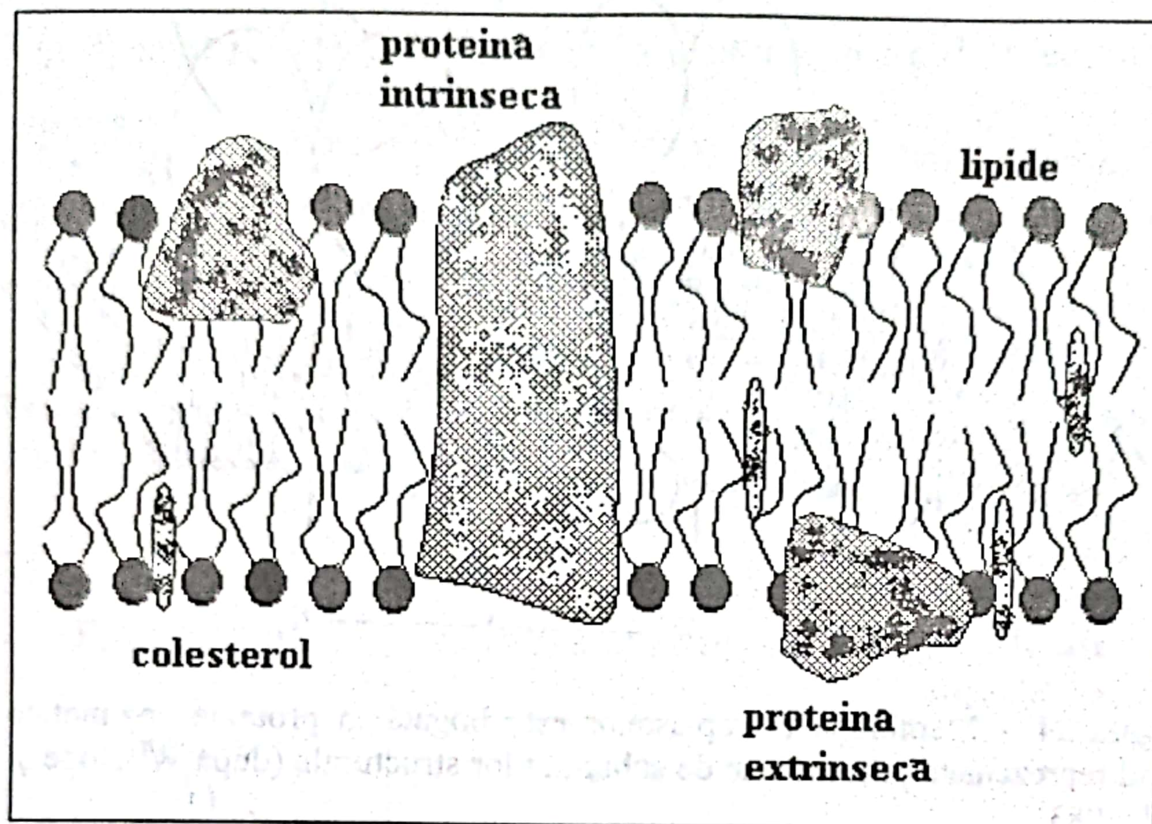


Figura 33. - Model structural al membranelor reprezentabile prin "mozaicul fluid" (după J. Darnell)

În modelul *mozaicului fluid* proteinele sunt în proporţie de circa 50% din masa totală a membranei şi sunt inserate în dublul strat lipidic, fie sub formă de proteine intrinseci - care străbat membrana de la o faţă la cealaltă, fie sub formă de proteine extrinseci, care sunt inserate în bistratul lipidic numai la nivelul feţei externe sau numai la nivelul feţei interne ale membranei.

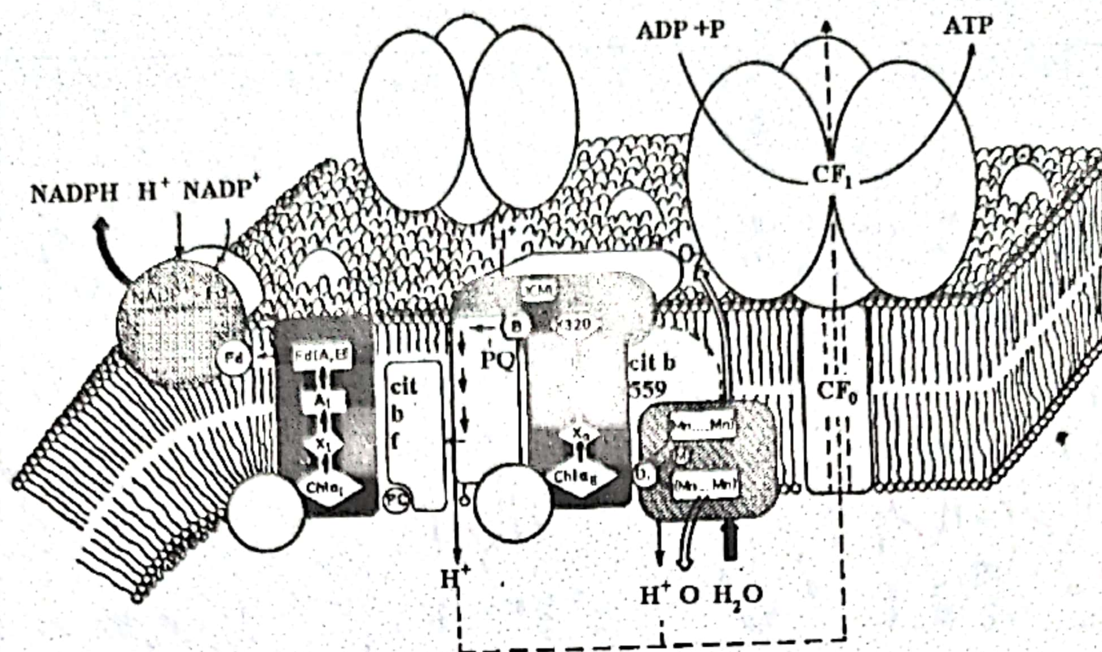


Figura 34. - Membrana cloroplastelor este bogată în proteine enzimatice fiind reprezentată prin modele de subunităţilor structurale (după W. Hope şi col. 1983).

În cazul altor tipuri de membrane, mai puţin răspândite în rândul celulelor eucariote, proteinele sunt prezente în proporţie de peste 70% în membrană şi sunt structurate conform unor modele bazate pe subunităţile lipoproteice - *modele bazate pe subunităţi lipoproteice* sau pe *micele de lipide*, bistratul lipidic ne mai fiind singura formă de organizare a lipidelor (Figurile 34 şi 35). Spre deosebire de proteinele care au rol în permeabilizarea membranei, principala funcţie a lipidelor este cea de barieră de permeabilitate pentru majoritatea tipurilor de ioni şi molecule implicate în funcţiile metabolice celulare (cu excepţia unor molecule liposolubile care pot străbate membrana

- de exemplu hormoni steroizi). În tabelele de mai jos (Tabelele 7 şi 8) sunt redate conţinuturile în proteine şi lipide precum şi câteva valori ale unor parametri fizici ai membranelor naturale şi ai membranelor artificiale bilipidice, aşa cum au fost sintetizaţi de V. Vasilescu şi col. (1977).

Tabelul 7. - Parametrii fizici ai unor biomembrane (după V. Vasilescu şi col. 1977)

Parametrul	**Membrane naturale**	**Membrane artificiale bilipidice**
Grosime (Å)	40-130	60-90
Rezistenţă electrică (Ω/cm)	10^2-10^5	10^3-10^9
Capacitate electrică (μF/cm^2)	0,5-1,3	0,3-1,3
Potenţial electric de repaus (mV)	10-88	0-140
Indice de refracţie	1,55	1,37
Tensiune superficială (erg/cm^2)	0,03-3,0	0,2-2,4
Permeabilitate pentru apă (10^{-4} cm/s)	25-28	2,3-24

Tabelul 8. Conţinutul de lipide şi proteine al unor biomembrane (după V. Vasilescu şi col. 1975)

Membrana	Proteine (%)	Lipide (%)
Eritrocit	60-80	20-40
Cloroplast	45	<55
Membrana externă a mitocondriei	55	<45
Teaca de mielină a axonului neuronal	20	<80
Bastonaş retinian	40-60	20-40

Structurile membranare cu cel mai mare conţinut de proteine sunt întâlnite pe de o parte la membranele microorganismelor şi pe de alta parte la celulele eucariote în membrana internă a mitocondriei (cu rol esenţial în fosforilarea oxidativă).

Colesterolul este o moleculă mai mică, din clasa steroizilor, prezentă în doar câteva procente în constituția membranelor ,dar având un rol bine determinat în controlarea fluidităţii şi, complementar, a rigidităţii membranei. Prezenţa colesterolului este deosebit de importantă pentru relativa stabilitate a formei membranei şi implicit a formei ansamblului perete celular - membrană - citoschelet.

10.2. Proteine canal şi canale ionice

Transportul moleculelor mici şi al ionilor prin biomembrane este efectuat la nivelul proteinelor canal şi al canalelor ionice.

Proteinele canal traversează membranele şi formează pori membranari - canale de dimensiuni transversale relativ mari şi relativ neselectivi - mai ales la nivelul membranelor bacteriilor, mitocondriilor şi cloroplastelor.

În membranele plasmatice ale celulelor animale şi vegetale sunt prezenţi "pori" de mare selectivitate şi de dimensiuni relativ mici - *canalele ionice*. Trecerea ionilor prin canalele ionice se efectuează numai în sensul gradientului electrochimic, deoarece aceste complexe proteice nu sunt cuplate la nici o sursă de energie (transport pasiv).

Spre deosebire de proteinele canal, canalele ionice nu sunt deschise tot timpul, ci deschiderea lor este activată în anumite condiţii. Principalele tipuri de perturbaţii de la nivelul membranelor celulare care sunt capabile să declanşeze activarea canalelor ionice sunt variaţiile de potenţial electric, stimularea mecanică şi legarea unei molecule semnal.

Există aşadar, canale ionice dependente de voltaj, canale ionice controlate mecanic şi canale ionice controlate de ligand.

Acestea din urmă pot fi controlate de o moleculă semnal din exteriorul celulei - un neurotransmiţător, de un ligand din interiorul celulei - un mediator intracelular, de o nucleotidă (cAMP sau cGMP) sau de o proteină reglatoare de tip G.

Importante date privind dinamica funcţională şi electrogenetică a canalelor ionice au fost furnizate datorită cercetărilor moderne privind microelectrofiziologia membranei celulare prin tehnica de "patch clamp".

De altfel, celulele excitabile animale, sunt reprezentative pentru varietatea de canale ionice identificate acestea fiind semnalate şi în regnul vegetal (cu rol de exmeplu în mobilitatea stimulată a frunzelor mimozei), sau în lumea microorganismelor (cu rol în locomoţie la Paramaecium sp.).

10.2.1. Tipuri de canale ionice

Actualmente se cunosc peste cincizeci de tipuri de canale ionice, dintre care menţionăm doar câteva tipuri:

- *canale rapide de sodiu;*
- *canale lente de sodiu şi calciu;*
- *canale de calciu voltaj dependente;*
- *canale lente pentru potasiu, voltaj dependente;*
- *canale lente pentru potasiu – calciu dependente;*

- *canale de clor voltaj dependente;*
- *canale cationice de acetilcolină;*

Canalele de potasiu (Figura 35) sunt direct implicate în electrogeneza potenţialului de mmbrană şi de acţiune controlând, trecerea liberă a ionilor de potasiu prin membrană. Deoarece concentraţia potasiului în interior este mai mare decât în exterior, are loc o difuzie masivă a potasiului sub acţiunea gradientului de concentraţie de la interior spre exteriorul celulei.

In prezenţa efectului Donnan, prin această deplasare, are loc un dezechilibru la nivelul sarcinilor electrice negative ale ionilor macromoleculari, nedifuzibili, existenţi în interiorul celulei .

Ionii de sodiu contribuie parţial la echilibrul electric al interiorului celulei, dar concentraţia lor în mediul intracelular este menţinută la nivel scăzut print - un transport activ generat sub acţiunea pompei de Na^+ - K^+.

Pentru menţinerea echilibrului electric şi respectiv al potenţialului membranar, al celulei neexcitate (în absenţa oricăror stimuli externi), o parte din ionii de potasiu din mediul extracelular sunt atraşi înapoi prin aceleaşi canale de potasiu - de forţele electrice care apar datorită efectului Donnan.

Canalele ionice voltaj dependente - joacă un rol esențial în generarea potențialelor de acțiune ale celulelor excitabile , în prezența unor stimuli specifici ca depolarizanți membranari.

Depolarizarea membranară atrage după sine prin micșorarea potențialului membranar, deschiderea unor canale de sodiu sensibile la voltaj (Figura 36).

Pe durata de timp cât rămân deschise, o mică cantitate de sodiu intră în celulă datorită unui gradient de concentrație membranar, accentuând depolarizarea, până când variația gradientului electric, contracarează gradientul de concentrație.

Aceste canale sunt prevăzute cu un mecanism automat de inactivare, determinând blocarea influxului de sodiu pentru o scurtă perioadă și reechilibrarea potențialului electric.

Activarea acestor canale, în maniera "totul sau nimic" a fost semnalată prin dezvoltării tehnicilor de investigație de tip *patch-clamp*. Aceasta permite ca o mică porțiune din membrană, reductibilă până la o zonă corespunzătoare unuia sau câtorva canale ionice să fie "captată" de deschiderea unei micropipete aplicată pe membrană.

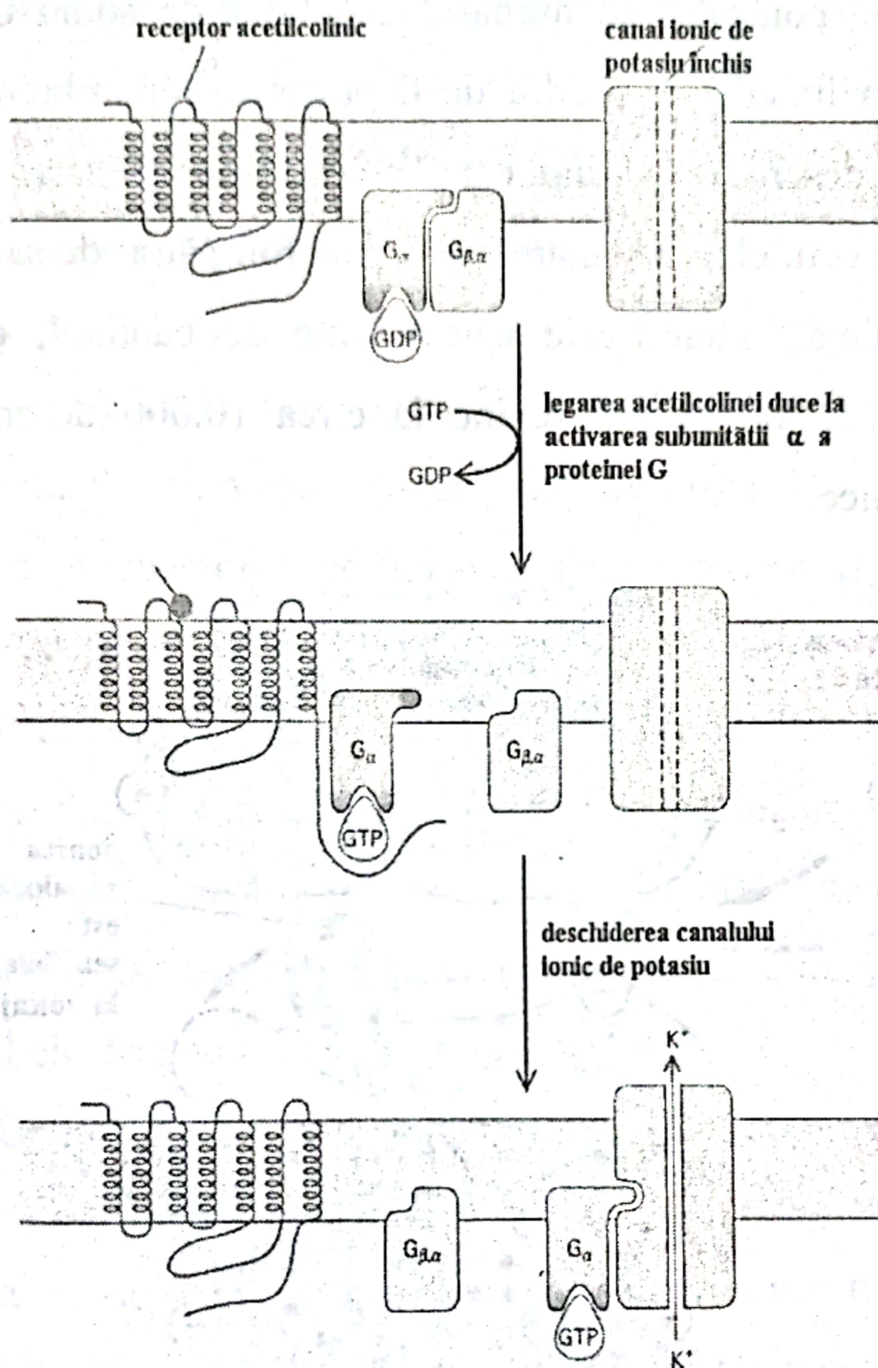


Figura 35. - Deschiderea unui canal de potasiu sub controlul acetilcolinei. Subunitatea G_{α} inactivă - purtătoare a GDP-ului este activată de acetilcolină şi leagă GTP-ul. Subunitatea $G_{\alpha\beta}$ preluând GTP-ul comandă deschiderea canalului (J. Darnell şi col. 1990).

S-a constatat că numărul canalelor de sodiu deschise variază în funcţie de gradul de depolarizare membranară, iar gradul de deschidere al unui canal nu prevede faze tranzitorii.

În celulele musculare, pe un micron pătrat de sarcolemă au fost deja identificate câteva sute de canale , ceea ce înseamnă că un canal revine la circa 10.000 de molecule fosfolipidice.

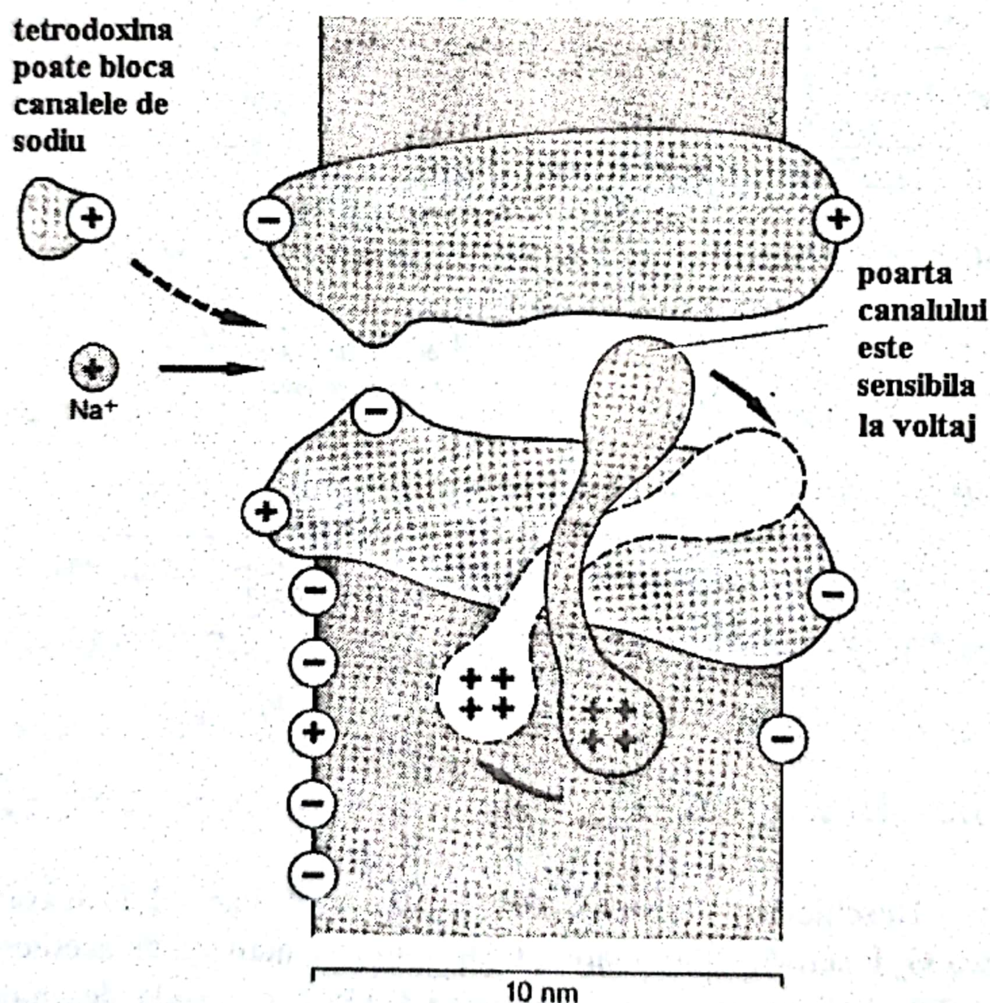


Figura 36. - Canal ionic de sodiu sensibil la voltaj (W. Hope şi col. 1983).

Densitatea relativ mică a canalelor este compensată , însă de conductanţa relativ mare prin parcurgerea unui canal de 8.000 de ioni pe milisecundă (ms).

Canalele cationice controlate de acetilcolină sunt destinate transducţiei semnalelor chimice extracelulare, în semnale electrice intracelulare, la nivelul sinapselor chimice dintre celulele nervoase şi celulele controlate de acestea, prevăzute cu receptori specifici acestui neurotransmiţător.

Receptorii colinergici sunt glicoproteine pentamerice, compuse din câte cinci subunităţi relativ insensibile la variaţii de potenţial membranar. Asemenea agregate proteice receptoare determină variaţii de permeabilitate membranară pentru sodiu, potasiu şi calciu, care cauzează ulterior variaţii de potenţial electric de membrană.

Contribuţia unuia sau altuia dintre cationi la fluxul transmembranar depinde de gradientul de concentraţie al fiecăruia şi de gradientul electric transmembranar. Influxul semnificativ de sodiu este în general, cel mai remarcabil indiciu al activării acestor canale (circa 30.000 ioni pe milisecundă pot parcurge fiecare canal activat).

Dacă celula inervată este celula musculară striată sau netedă, atunci influxul masiv de sodiu determină o depolarizare electrică care reprezintă şi semnalul declanşator al cuplului

excitaţie contracţie (M. Isac şi R. M. Isac 1985; F. Topoliceanu şi I. Haulică 1989; M. Isac şi R. M. Isac 1990; M. Isac şi R. M. Isac 1991; M. Isac şi R. M. Isac 1994).

Ca şi canalele de sodiu voltaj dependente, canalele controlate de acetilcolină, rămân deschise pe o perioadă de timp relativ scurtă, în decursul căreia molecula semnal cuplată la zona receptoare de la faţa externă a membranei postsinaptice este degradată (hidrolizată).

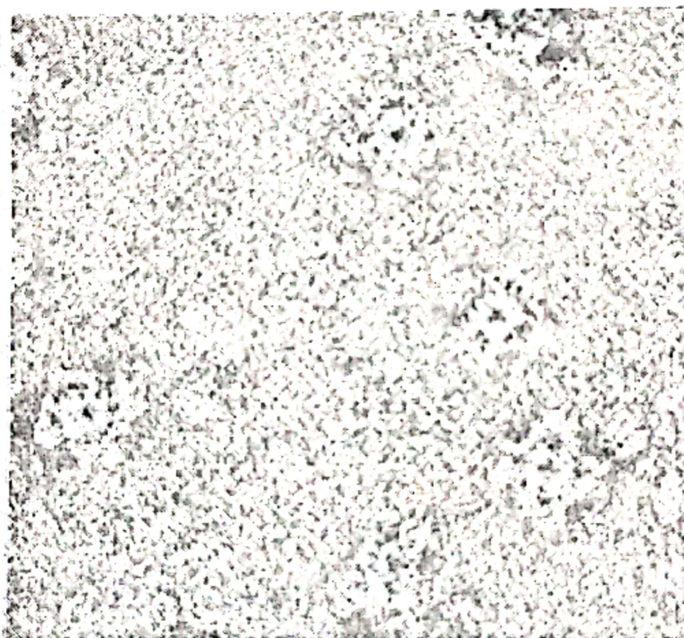


Figura 37. - Imagini obţinute la microscopul electronic pentru câteva agregate proteice cu funcţie de canale ionice de calciu extrase din membrana depozitelor intracelulare de calciu de la nivelul reticulului endoplasmic (J. Darnell şi col. 1990)

În Figura 35 este redată funcţionarea unui canal ionic de potasiu, activat de acetilcolină, cuplată la un receptor

membranar care deşi, nu este parte constituentă a canalului ionic , prin intermediul unei *proteine G*, poate realiza controlul deschiderii acestui canal. In acest caz, se poate spune că cele mai variate tipuri de canale se întâlnesc în cazul ionilor de potasiu.

Unul dintre canalele ionice cel mai mult studiate este cel de calciu (Figurile 37 şi 38) de la nivelul rezervelor citoplasmatice ataşate reticulului endoplasmic (cu rol deosebit de important în contracţia fibrelor musculare).

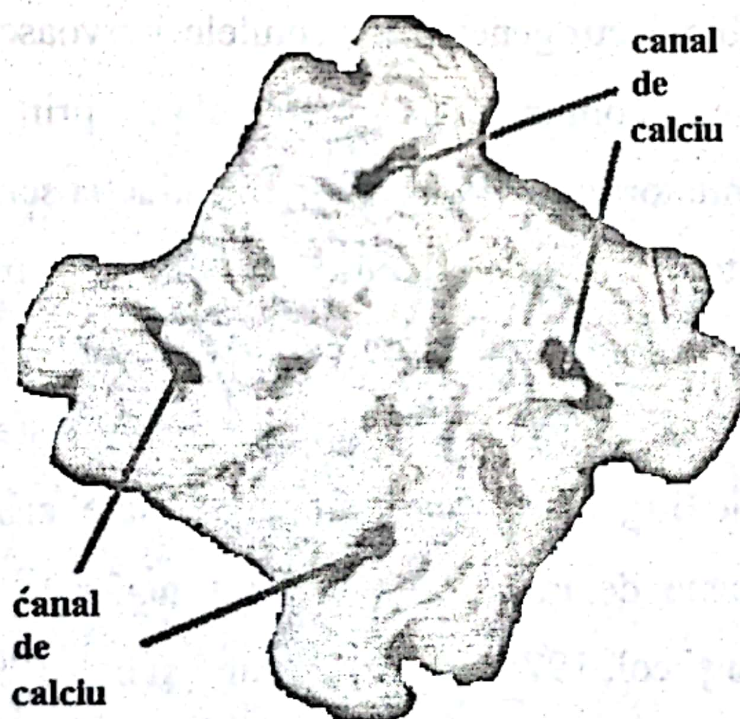


Figura 38. - Agregatul proteic care asigură eliberarea ionilor de calciu din depozitele citoplasmatice în citoplasmă (J. Darnell şi col. 1990)

Imaginea tridimensională (Figura 38), reconstruită din datele microscopiei electronice arată că agregatul proteic

corespunzător este format din patru subunități identice fiecare cu câte un canal pentru ioni de calciu.

10.3.Permeabilitatea şi transportul transmembranar

Proprietatea de permeabilitate selectivă a biomembranelor pentru ioni mici (Na^+, K^+, Ca^{+2}, Cl^-, Mg^{+2}, etc.) ajută la explicarea a numeroase fenomene de importanță vitală pentru activitatea celulară: transportul la nivelul epiteliilor, bioelectrogeneza din celulele nervoase, musculare, vizuale, etc., comunicarea intercelulară prin intermediul neurotransmițătorilor şi hormonilor, transducția senzorială, etc.

Odată cu rolul de conturare şi delimitare morfologică a structurilor celulare, membrana celulară constituie o veritabilă barieră de control selectiv a schimburilor de substanță , energie şi informație,(Figura 39) care sunt modulate prin intervenția unor fenomene de micro – şi macrotransfer membranar (F. Topoliceanu şi col. 1974; F. Topoliceanu şi col. 1991).

Principalele tipuri de transport prin membrane sunt: *macrotransportul* (transport de particule şi macromolecule) şi *microtransportul* (molecule mici şi ioni).

• *Macrotransportul* poate fi efectuat direct sau prin intermediul veziculelor, sub formă de: *endocitoză, exocitoză şi transcitoză.*

In *endocitoză* are loc o intrare în celulă a particulelor de substanţă, virusuri şi macromolecule, în timp ce în *exocitoză* din contra acestea ies din celulă, iar în *transcitoză* sunt transportate spre celulă particule de substanţă şi macromolecule pentru ca, iar după o serie de transformări metabolice din celulă sunt transferate, atât macromolecule cât şi particule.

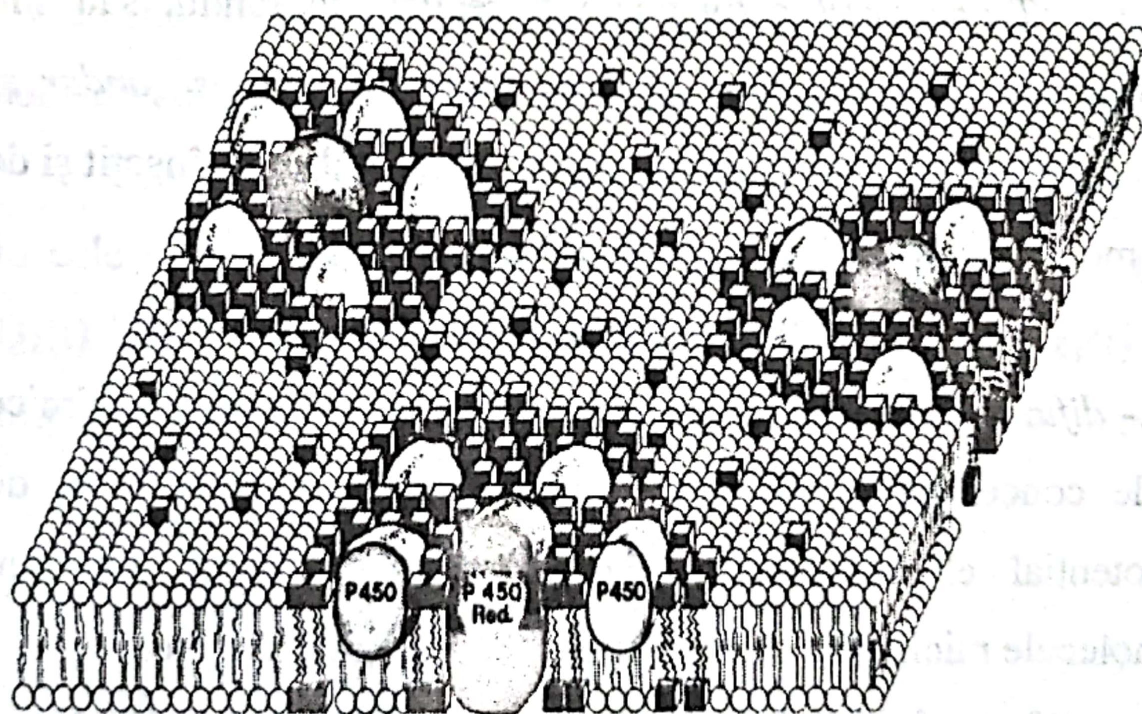


Figura 39. - Model membranar bazat pe domenii de proteine enzimatice încastrate în bistratul lipidic rigid. (W. Hope şi col. 1983)

• ***Microtransportul*** în raport cu implicarea unor surse energice sau absenţa lor, în realizarea transferului de substanţă, acesta poate fi:

a.- *transport activ* care este efectuat prin intermediul pompelor ionice şi care necesită un cuplaj energetic cu procesele exergonice de la care se preia şi se consumă o parte din energia stocată în moleculele de tipul ATP (adenozintrifosfat), NADH (nicotinanidadenindinucleotid), etc.

b.- *transport pasiv* este realizat fără consum de energie metabolică, prin intermediul canalelor ionice.

Transportul activ poate fi realizat la rândul său sub formă de transport *activ primar*, transport *activ secundar* şi *translocaţie de grup* (transportul unei molecule este însoţit şi de o modificare).

Transportul pasiv se desfăşoară sub două forme:

a.- *difuzie simplă* prin care în prezenţa unor gradiente chimice (de concentraţie) sau electrochimice (de concentraţie şi de potenţial electric), se realizează circulaţia unor ioni sau molecule mici, cum sunt cele de apă, uree, glucoză, etc.

b.- *difuzie facilitată* este efectuată prin intermediul unor *proteine transportoare* care cuplează solvitul la una din feţele membranei şi, prin modificări conformaţionale (în absenţa unui

consum energetic direct), îl eliberează la cealaltă faţă membranară.

10.4. Transportul pasiv

10.4.1. Difuzia simplă

Se consideră un ansamblu de două compartimente (Figura 40) care comunică între ele printr-o membrană semipermeabilă (permeabilă pentru specia moleculară considerată) de grosime **x**, cu suprafaţa transversală **A** şi cu coeficientul de difuzie **D** (pentru specia moleculară considerată).

Cantitatea din substanţa difuzibilă **S** aflată la momentul **t** în cele două compartimente se notează cu **$Q_1(t)$** şi respectiv **$Q_2(t)$** iar concentraţiile corespunzătoare se notează cu **$c_1(t)$** şi respectiv **$c_2(t)$**, astfel că:

$$c_1(t)=\frac{Q_1(t)}{V_1},c_2(t)=\frac{Q_2(t)}{V_2}$$
$$Q_1(t)+Q_2(t)=Q=\text{const.} \qquad (39)$$

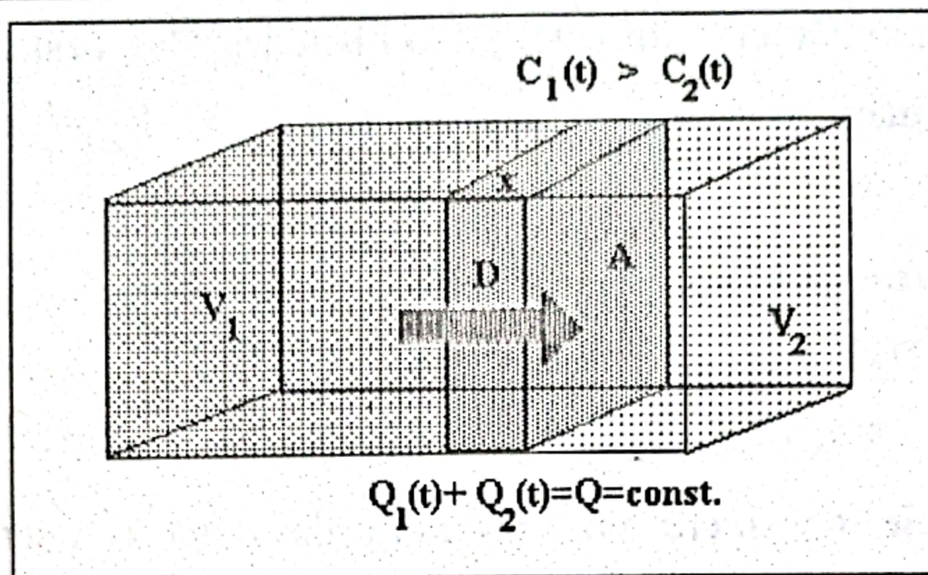


Figura 40. - Sistem bicompartimentat cu membrană de grosime *D* şi secţiune transversală *A*

Circulaţia substanţei difuzibile între cele două compartimente se realizează în sensul gradientului chimic deci, dacă $\mathbf{c_1(t) > c_2(t)}$, atunci membrana va fi străbătută dinspre primul compartiment înspre al doilea.

Conform legilor difuziei:

$$-\frac{dQ_1(t)}{dt} = \frac{AD}{x}\left(K_{m1}c_1(t) - K_{m2}c_2(t)\right) \qquad (40)$$

unde $\mathbf{K_{m1}}$ şi $\mathbf{K_{m2}}$ sunt coeficienţi de partiţie (rapoartele de distribuţie) ai substanţei S între membrană şi câte unul din cele două compartimente.

Se notează:

$$K_1 = \frac{K_{m1}}{V_1}, K_2 = \frac{K_{m2}}{V_2} \tag{41}$$

astfel că relaţia (41) devine:

$$-\frac{dQ(t)}{dt} = \frac{AD}{x}(K_1Q_1(t) - K_2Q_2(t)) \tag{42}$$

Această ecuaţie diferenţială de ordinul întâi are ca necunoscută pe $Q_1(t)$, deci:

$$-\frac{dQ_1(t)}{dt} = [KQ_1(t)(K_1 + K_2) - KK'_2] \tag{43}$$

S-au făcut notaţiile:

$$K = \frac{AD}{x}, K'_2 = K_2Q \tag{44}$$

După separarea variabilelor şi introducerea noilor constante K_{12} şi K'_2:

$$K_{12} = K(K_1 + K_2), K''_2 = K'_2 K \tag{45}$$

se obţine:

$$-\frac{dQ_1(t)}{K_{12}Q_1(t)-K''_2}=dt \qquad (46)$$

ceea ce, prin integrare (cu condiţia iniţială $Q_1(0)=Q_1(t=0)$) conduce la:

$$e^{-K_{12}t}=\frac{K''_2-K_{12}Q_1(t)}{K''_2-K_{12}Q_1(0)} \qquad (47)$$

De aici se deduce expresia de variaţie în timp a lui $Q_1(t)$:

$$Q_1(t)=\left[Q_1(0)-\frac{K'_2}{K_1+K_2}\right]e^{-K_{12}t}+\frac{K'_2}{K_1+K_2} \qquad (48)$$

Prin împărţire cu V_1 se obţine expresia de variaţie în timp a concentraţiei substanţei **S** în primul compartiment:

$$c_1(t)=\left[c_1(0)-\frac{Q}{V*}\right]e^{-K_{12}t}+\frac{Q}{V*} \qquad (49)$$

unde s-a notat cu **V***:

$$V^* = \frac{K_{m1} + K_{m2}\dfrac{V_1}{V_2}}{\dfrac{K_{m2}}{V_2}} \tag{50}$$

Se observă că:

$$c_1(\infty) = \frac{Q}{V^*} \tag{51}$$

Astfel se obţine:

$$c_1(t) - \frac{Q}{V^*} = \left(c_1(0) - \frac{Q}{V^*}\right)\exp\left(-\frac{AD}{x}\left(\frac{K_{m1}}{V_1} + \frac{K_{m2}}{V_2}\right)\right)t \tag{52}$$

ceea ce reprezintă, *scăderea exponenţială în timp* a concentraţiei din primul compartiment (sub acţiunea gradientului de concentraţie) *dependent de grosimea şi suprafaţa transversală a membranei*, de *cantitatea totală de substanţă difuzibilă* din cele două compartimente şi de *valoarea concentraţiei de echilibru* (după un timp suficient de îndelungat) din compartimentul considerat.

Astfel s-ar desfăşura, de exemplu, procesul de difuzie al moleculelor de apă prin "porii apoşi" ai biomembranelor în

cadrul modelului prezentat. În cazul ionilor trebuie luat în considerare şi gradientul electric transmembranar corespunzător.

10.4.2. Difuzia facilitată

Ca şi în cazul difuziei simple, difuzia facilitată prin biomembrane a unor substanţe se produce sub acţiunea gradientului electrochimic dispărând odată cu anularea acestuia.

Spre deosebire de difuzia simplă, efectuată prin intermediul canalelor ionice şi porilor moleculari, difuzia facilitată, efectuată prin intermediul proteinelor transportoare (*carrier*), poate să se producă cu o viteză mult mai mare decât cea corespunzătoare dimensiunilor sau liposolubilităţii moleculelor respective, viteză care atinge o valoare de saturaţie la creşterea gradientului de concentraţie şi poate fi afectată de prezenţa unor substanţe cu structuri analoge substanţei difuzate.

Din aceste puncte de vedere acest fenomen de microtransport prezintă asemănări cu procesele enzimatice, a căror viteză atinge o limită de saturaţie şi care sunt, în acelaşi timp, procese de competitivitate - competiţia dintre două substanţe cu structuri asemănătoare fiind de natură să inhibe participarea la procesul de transport (sau enzimatic) a

substanţei urmărite. Deşi, la fel ca şi relaţia enzimă - substrat, relaţia substanţă difuzată - proteină transportoare se caracterizează printr-o anume specificitate.

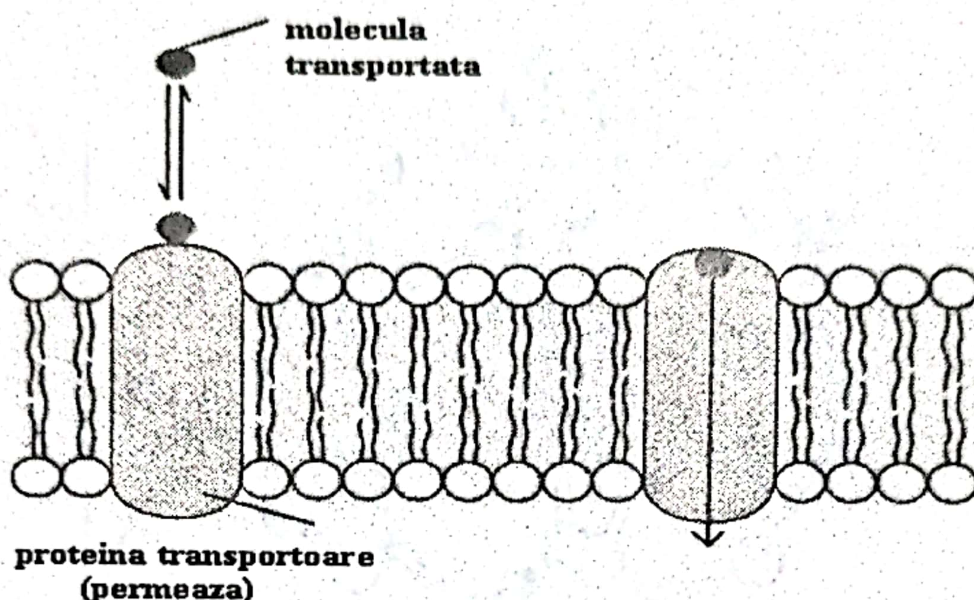


Figura 41. - Proteinele transportoare (permeaze) (după J. Darnell şi col. 1990)

Proteina transportoare, deşi nu se cuplează în mod direct cu procese biochimice exergonice, este capabilă să efectueze mişcări complexe prin care substanţa difuzantă este captată la una din feţele membranei, apoi este transportată (Figura 41) la faţa opusă (proteina transportoare fiind de tip intrinsec, adică străbătând membrana de la o faţă la alta) unde este eliberată.

Unii autori includ în acest tip de microtransport şi permeabilitatea de tip ionoforetic (Figura 42) prin care ionoforii

(molecule cu structură peptidică sau nu, de exemplu nistatina, amfotericina, valinomicina, etc.) prezenţi în membrană efectuează transpotul unor ioni mici.

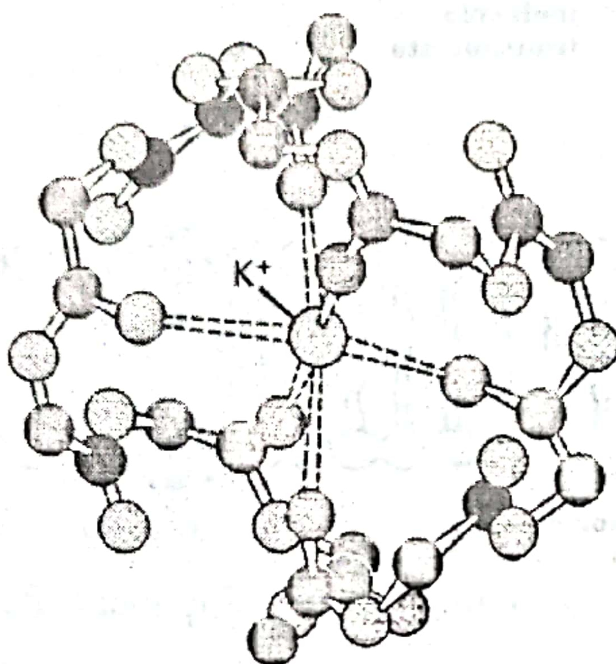


Figura 42.- Valinomicina realizează transportul ionoforic al ionului de potasiu prin biomembrane (după J. Darnell 1990)

În Figura 43 este redată o comparaţie între cele două tipuri de difuzie. Relaţia matematică ce se poate scrie pentru procesele de difuzie facilitată este de forma:

$$v(c)=\frac{cv_{max}}{k_M+c}, \qquad (53)$$

unde: **v** este viteza de difuzie, **c** este concentraţia, k_M este o constantă egală cu valoarea concentraţiei care reduce la jumătate viteza maximă de difuzie.

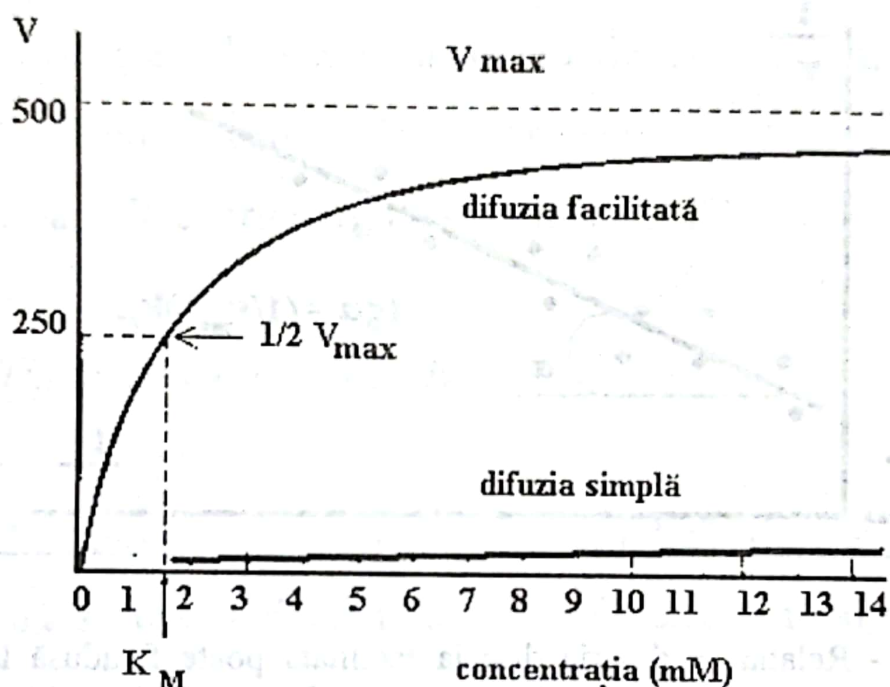


Figura 43. - Comparaţie grafică între difuzia simplă şi difuzia facilitată

În formă inversată, relaţia este deosebit de uşor de verificat în experimente, deoarece conduce la o dependenţă lineară ce se stabileşte prin metoda celor mai mici pătrate şi permite calcularea parametilor v_{max} şi k_M din panta şi tăietura la ordonată a dreptei (Figura 44) celei mai probabile:

$$\frac{1}{v(c)} = \frac{k_M}{v_{max}c} + \frac{1}{v_{max}} \qquad (54)$$

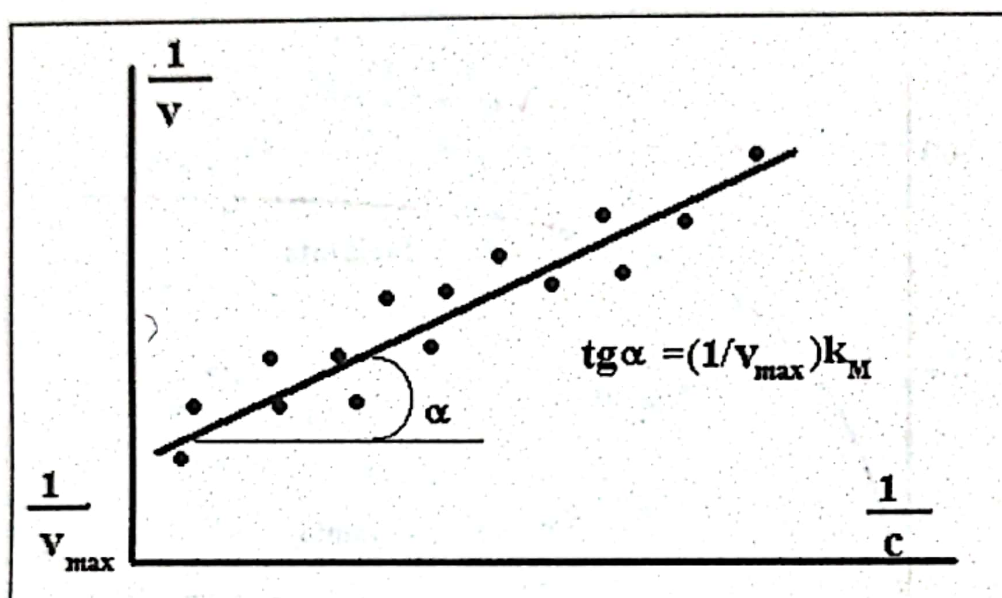


Figura 44. - Relaţia ce descrie difuzia facilitată poate fi adusă la formă lineară, convenabilă măsurătorilor practice, prin inversarea relaţiei dintre viteză şi concentraţie

Prin difuzie facilitată se explică transportul prin membrana eritrocitară, a anionilor moleculari de uree, glicerol şi alţi neelectroliţi, transportul prin membrana musculară şi epiteliul intestinal al glucozei şi aminoacizilor, transportul glucidelor prin membranele microorganismelor.

10.5. Transportul activ

Un astfel de transfer de masă de tip microtransfer se efectuează împotriva gradientului electrochimic şi se realizează pe baza energiei eliberate într-o reacţie exergonică, cel mai frecvent fiind vorba de hidroliza legăturilor fosfat, acumulatoare de energie, din molecula de ATP.

10.5.1. Tipuri de transport activ

- *Transportul activ primar* implică deplasarea prin membrană a unor ioni mici care beneficiază în mod direct de energia eliberată în reacţia ATP-ADP;
- *Transportul activ secundar* (Figura 45) asigură deplasarea unor ioni mici care beneficiază de modificarea de gradient electrochimic cauzată de transportul activ primar al altor tipuri de ioni mici. După cum ionii care se transportă pe baza energiei eliberate de hidroliza ATP-ului circulă în acelaşi sens sau în sens opus transportului activ primar, transportul activ secundar poate fi de tip *sinport* şi respectiv *antiport*.

Tot o formă de transport activ este şi *translocaţia de grup,* prin care structura unei molecule deplasată prin

membrană este modificată la nivelul unui grup de constituenţi de atomi.

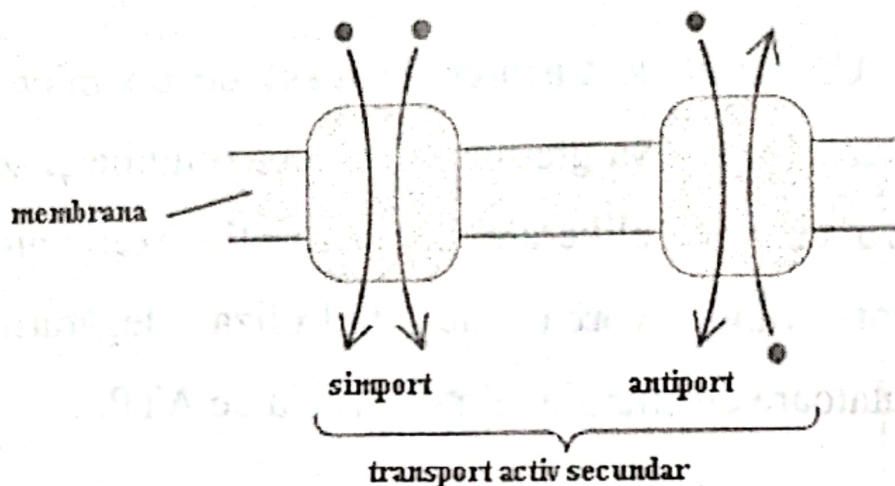


Figura 45. - Transportul activ secundar poate fi sinport sau antiport (după J. Darnell şi col. 1990)

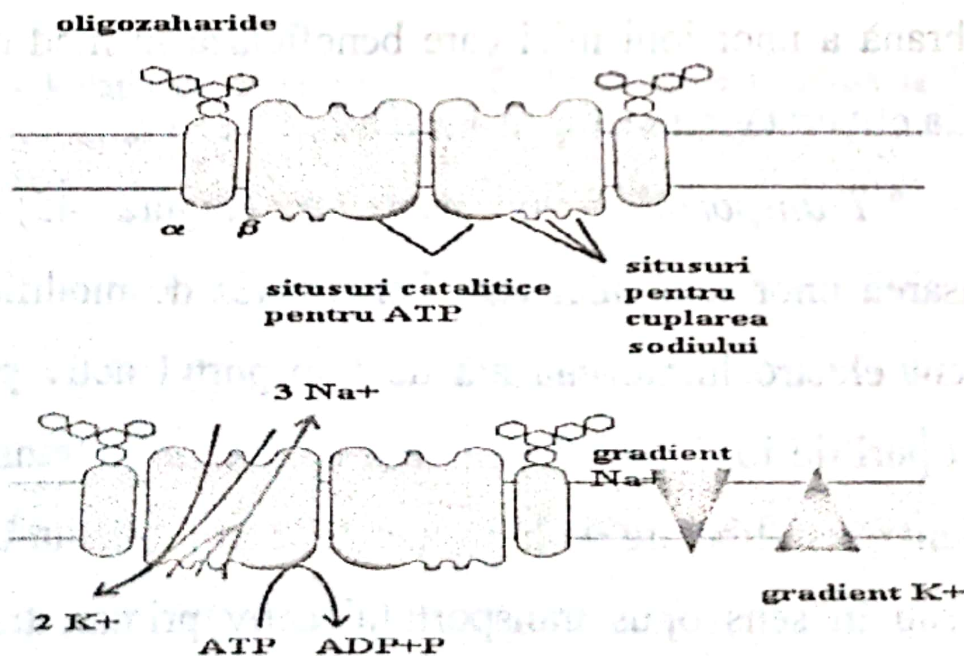


Figura 46. - Structura şi rolul pompei de sodiu şi potasiu (după J. Darnell şi col. 1990)

10.5.2. Pompele ionice

Energia utilizată în transportul activ este eliberată ca urmare a activării unei enzime, *ATP - aza* membranară, care face parte din structura "pompelor ionice" de Na^{+}, K^{+}, Ca^{+2}, etc., numite şi ATP - aze de Na^{+}, K^{+}, Ca^{+2}, etc.

Pompele ionice sunt denumite astfel deoarece "pompează" ionii în sens invers gradientului electrochimic în mod similar unei pompe care acţionează pentru deplasarea unui fluid împotriva gradientului de presiune. Ele sunt agregate proteice, formate din mai multe subunităţi structurale care determină deplasarea ionilor în sens invers difuziei pasive.

• *ATP - aza de Na^{+} şi K^{+}* prezentă (Figura 46) în membrana plasmatică (plasmalema) la majoritatea celulelor animale, asigură un eflux activ de sodiu şi un influx activ de potasiu care pot contrabalansa influxul pasiv de sodiu şi respectiv efluxul pasiv de potasiu (Figura 47), prin mobilizarea a circa 30% din ATP - ul destinat proceselor metabolice dintr-un organism animal aflat în repaus. Aceasta deoarece concentraţia de sodiu ionic este mai mare în interiorul celulei decât în exterior în timp ce concentraţia de potasiu este mai mare în interiorul celulei decât în mediul extracelular.

Raportul dintre numărul de ioni de sodiu şi cel de potasiu, antrenaţi de pompa de Na^+ - K^+ (pompa ionică de sodiu şi potasiu) este de 3/2. Pompa este blocată de ouabaină (F. Topoliceanu şi I. Haulică 1965; F. Topoliceanu şi I. Haulică 1972; F. Topoliceanu şi I. Haulică 1975).

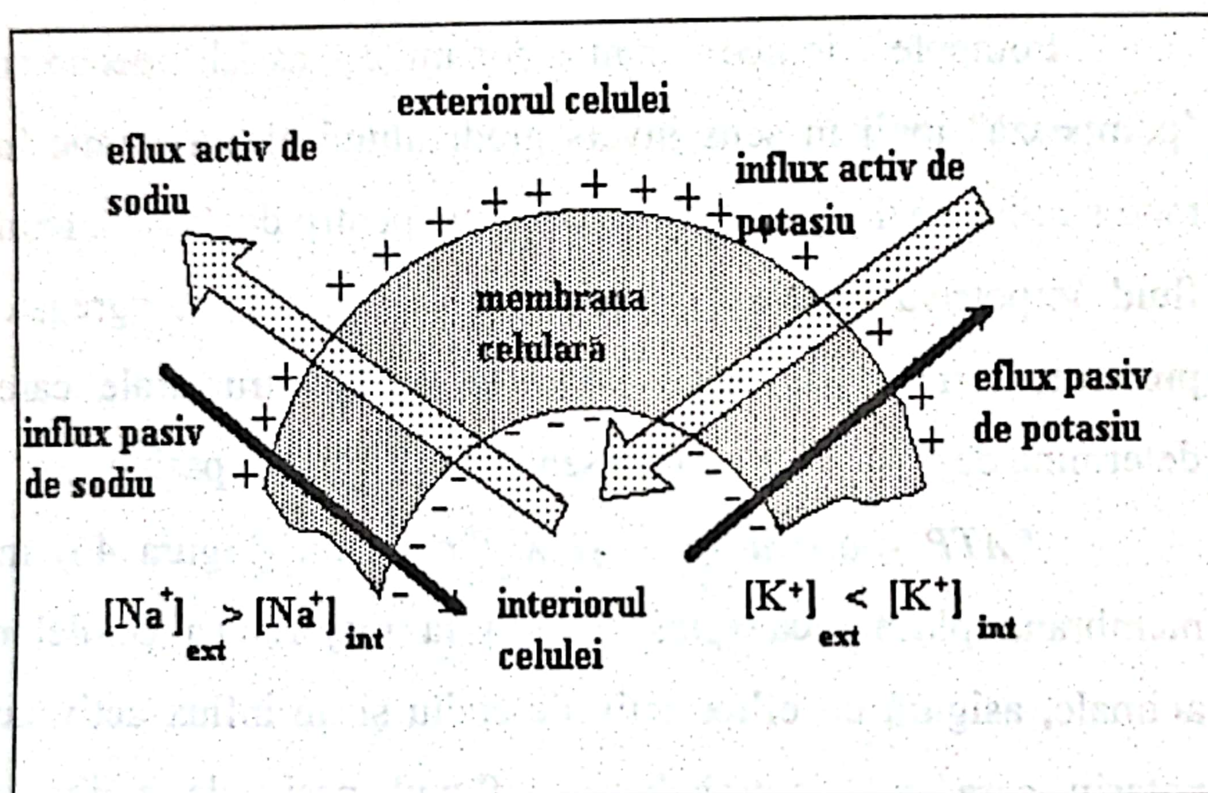


Figura 47. - Transportul pasiv şi transportul activ printr-o biomembrană

La celulele renale s-au identificat cele mai multe astfel de pompe ionice precizându-li-se şi structura tetramerică (dată de asocierea unei subunităţi cu proprietăţi enzimatice, cu situsuri de legare a ionilor de sodiu la faţa internă a membranei

- subunitatea α - şi a unei subunităţi glicoproteice, cu situsuri de legare a ionilor de sodiu la faţa externă a membranei - subunitatea β.

• *ATP - aza de* Ca^{+2} este bine reprezentată în membranele reticulului sarcoplasmic (reticulul endoplasmic din celulele musculare) - ionii de calciu având un rol important în bioelectrogeneza celulei musculare.

• *ATP - aza de* H^+ *şi* K^+ este prezentă mai ales în plasmalema celulelor din mucoasa gastrică asigurându-se un eflux activ de protoni şi un influx activ de ioni de potasiu.

Un caz mai aparte îl reprezintă *pompa de protoni* din membranele citoplasmatice ale procariotelor şi în membrana internă a mitocondriilor, care asigură realizarea efluxului de protoni simultan cu catalizarea fosforilării ADP-ului, reprezentând deci o ATP - sintetază, conform mecanismului propus de Mitchel (Benga 1976). Energia provine din procesele redox localizate în aceste tipuri de membrane şi pe baza ei se deplasează protonii şi se fosforilează ADP-ul.

• *Pompa de protoni bacteriană,* este mai puţin răspândită fiind localizată în membrana bacteriei *Halobacterium halobium* care utilizează energia luminoasă,

prin intermediul unei proteine de membrană numită bacteriorodopsină.

10.6. Ecuaţii diferenţiale pentru descrierea cantitativă a bilanţului transportului activ şi pasiv

Se consideră, pentru exemplificare, cazul ionilor de sodiu, la care se urmăreşte variaţia concentraţiei din mediul intracelular (din citoplasmă). Viteza de variaţie a concentraţiei intracelulare are două componente, cea pasivă şi cea activă:

$$\frac{d[Na]_i}{dt} = \frac{d[Na]^p{}_i}{dt} + \frac{d[Na]^a{}_i}{dt} \tag{55}$$

Pentru explicarea fiecărei componente se are în vedere faptul că procesele de intruzie, respectiv extruzie a ionilor prezintă un caracter parţial stocastic, atât difuzia pasivă cât şi transportul activ fiind, fiecare din ele, rezultanta unor intrări şi ieşiri în şi din celulă. Astfel, transportul pasiv transmembranar poate fi descris prin ecuaţia:

$$\frac{d[Na]_i{}^p}{dt} = k_1[Na]_e - k_2[Na]_i \tag{56}$$

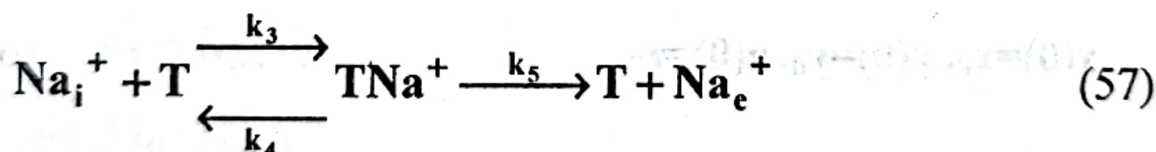
k_1 şi k_2 fiind constantele de viteză (măsurate în s^{-1}) iar $[Na]_e$ şi $[Na]_i$ fiind concentraţiile ionice în exteriorul şi respectiv interiorul celulei.

Desigur că există relaţia: $k_1>k_2$ după cum şi $k_3>k_4$ în cazul transportului activ, modelat fenomenologic şi cantitativ după cum se poate vedea mai jos.

Acţiunea transportoare a pompei de Na^+ (Figura 48)este redată prin cuplarea reversibilă a acestui agregat proteic cu ionii de Na^+ (constantele de viteză fiind k_3 şi k_4) şi cedarea acestor ioni la faţa externă a membranei (constanta de viteză fiind k_5).

În relaţiile matematice care urmează se presupune că ionul şi transportorul proteic formează un complex, notat.

Deci procesele care conduc la transportul activ se pot reprezenta schematic astfel:



$$Na_i^+ + T \underset{k_4}{\overset{k_3}{\rightleftarrows}} TNa^+ \xrightarrow{k_5} T + Na_e^+ \qquad (57)$$

Ecuaţiile diferenţiale corespunzătore sunt de forma:

$$\frac{d[Na]_i}{dt} = -k_3[T][Na]_i + k_4[TNa]$$
$$\frac{d[TNa]}{dt} = k_3[T][Na]_i - k_5[TNa] - k_4[TNa] \qquad (58)$$

De aici şi din ecuaţia diferenţială a transportului pasiv se vede că:

$$\frac{d[Na]_i}{dt} = k_1[Na]_e - k_2[Na]_i - k_3[Na]_i[T] - k_4[TNa] \qquad (59)$$

Notăm:

$$[Na]_i=x,\ [TNa]=y,\ [Na]_e=z \qquad (60)$$

şi, la momentul iniţial, **t=0**, avem:

$$x(0)=x_0,\ y(0)=y_0,\ z(0)=z_0, \qquad (61)$$

adică, tot sodiul ionic este prezent doar la interiorul celulei. Se poate considera, în baza conservării cantităţii totale de sodiu, în ipoteza unor volume egale, că:

$$z = (x_0 + y_0) - (x + y) \qquad (62)$$

Sistemul de ecuaţii diferenţiale ce urmează a se rezolva are forma:

$$\begin{aligned} \frac{dx}{dt} &= k_1 z - k_2 x - k_3 x[T] + k_4 y \\ \frac{dy}{dt} &= k_3 x[T] - (k_4 + k_5)y \end{aligned} \qquad (63)$$

Folosind ecuaţia (62), variabila **z** se înlocuieşte şi se pot face notaţiile:

$$\begin{aligned} c_1 &= k_1 + k_2 + k_3[T] \\ c_2 &= k_1 \\ c_3 &= k_4 - k_1 \\ c_4 &= k_4 + k_5 \\ c_5 &= k_3[T] \end{aligned} \qquad (64)$$

Sistemul ia forma:

$$\begin{aligned} \frac{dx}{dt} &= -c_1 x + c_2(x_0 + y_0) + c_3 y \\ \frac{dy}{dt} &= -c_4 y + c_5 x \end{aligned} \qquad (65)$$

Pentru rezolvare se procedează la diferenţierea ambelor ecuaţii în raport cu timpul:

$$\begin{aligned} \frac{d^2x}{dt^2} &= -c_1\frac{dx}{dt} + c_3\frac{dy}{dt} \\ \frac{d^2y}{dt^2} &= -c_4\frac{dy}{dt} + c_5\frac{dx}{dt} \end{aligned} \qquad (66)$$

Din sistemele (65) si (66) se obţin ecuaţii cu câte o singură variabilă:

$$\begin{aligned} \frac{1}{c_3}\frac{d^2x}{dt^2} + \frac{c_1+c_4}{c_3}\frac{dx}{dt} - \left(\frac{c_4c_1}{c_3} + c_5\right)x &= c_2(x_0+y_0)\frac{c_4}{c_3} \\ \frac{1}{c_5}\frac{d^2y}{dt^2} + \frac{c_4+c_1}{c_5}\frac{dy}{dt} - \left(c_3 + \frac{c_1c_4}{c_5}\right)y &= c_2(x_0+y_0) \end{aligned} \qquad (67)$$

Se trece la ecuaţiile caracteristice (în variabila **r**, de exemplu) ale căror soluţii $r_1'=r_1\equiv\alpha$, $r_2'=r_2\equiv\beta$ sunt de forma:

$$r_{1,2} = \frac{1}{2}\left[-(c_1+c_4) \pm \sqrt{(c_1-c_4)^2 + c_3c_5}\right] = r'_{1,2}\,\alpha, \beta \qquad (68)$$

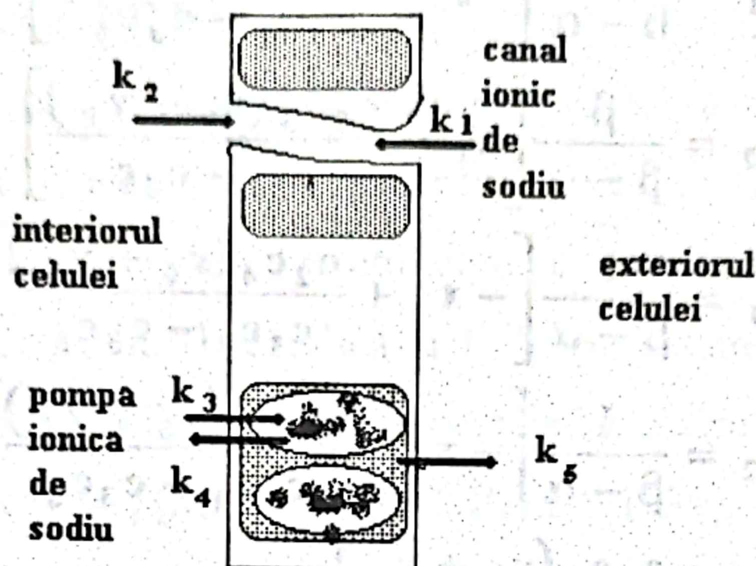


Figura 48. - Reprezentarea modelului bilanţului transportului pasiv şi activ prin membrane biologice (după F. Gremy şi J. Perrin 1975)

Căutăm soluţiile de forma:

$$
\begin{aligned}
x &= x_1 + x_2 = A_1 e^{-\alpha t} + B_1 e^{-\beta t} + C_1 \\
y &= y_1 + y_2 = A_2 e^{-\alpha t} + B_2 e^{-\beta t} + C_2
\end{aligned}
\qquad (69)
$$

Din condiţia ca aceste sisteme să verifice sistemul de ecuaţii propus şi din condiţiile iniţiale se obţin coeficienţii de mai jos:

$$
\begin{aligned}
A_1 &= \frac{\beta}{\beta-\alpha}\left[x_0 - \frac{c_2 c_4 (x_0 + y_0)}{c_1 c_4 - c_3 c_5}\right] \\
A_2 &= \frac{\beta}{\beta-\alpha}\left[x_0 - \frac{c_2 c_5 (x_0 + y_0)}{c_1 c_4 - c_3 c_5}\right] \\
B_1 &= \frac{1}{\beta-\alpha}\left[-x_0 + \frac{c_2 c_4 (x_0 + y_0)}{c_1 c_4 - c_3 c_5}\right] \\
B_2 &= \frac{1}{\beta-\alpha}\left[-x_0 + \frac{c_2 c_5 (x_0 + y_0)}{c_1 c_4 - c_3 c_5}\right] \\
C_1 &= \frac{c_2 c_4 (x_0 + y_0)}{c_1 c_4 - c_3 c_5} \\
C_2 &= \frac{c_2 c_5 (x_0 + y_0)}{c_1 c_4 - c_3 c_5}
\end{aligned}
\tag{70}
$$

Cu aceste expresii ale coeficienţilor soluţiilor propuse se obţin relaţiile ce dau dependenţele de constantele de viteză şi de concentraţia de pompe ionice din membrană, ale concentraţiilor de ioni de sodiu la exteriorul membranei, la interiorul acesteia precum şi concentraţia de transportori cuplaţi cu ioni de sodiu.

Atât concentraţiile ionice cât şi constantele de viteză se pot determina experimental prin metode bazate pe izotopi radioactivi, ceea ce a stat şi la baza verificării aplicabilităţii

acestui model matematic în cazul membranei eritrocitare (F. Topoliceanu şi col.1977).

Dintre preocupările cercetătorilor ieşeni asupra unor aspecte experimentale ale transportului activ, menţionăm cercetările privind bazele electrochimice ale transportului transepitelial de sodiu (I. Haulică şi F. Topoliceanu 1967; F. Topoliceanu şi I. Haulică 1972), sau pe cele bazate pe utilizarea izotopilor radioactivi, (M. Isac şi S. C. Bumbu 1979).

10.7. Structurile membranare semipermeabile şi percolarea

Atât în cazul membranelor celulare cât şi al structurilor membranare macroscopice porii permeabili pentru molecule mici sunt formaţiuni caracterizate de o geometrie mai degrabă neregulată, în primul caz modelele cele mai frecvent utilizate sugerând continuitatea canaliculelor pe toată grosimea membranei dar şi instabilitatea lor temporală, iar în al doilea caz, din contra, se admite constanţa în timp a reţelei de pori dar şi numeroase ramificaţii ale acestora între cele două feţe ale membranei.

Traseul apei şi al altor molecule mici şi ioni printr-o structură membranară macroscopică are, deci un caracter

impredictibil, deoarece nu se poate cunoaşte prin care din ramificaţiile canaliculare existente se deplasează fluxurile de ioni şi molecule. Ceea ce se semnalează cu precizie este starea iniţială şi cea finală a fluidului ce se filtrează.

Odată cu dezvoltarea teoriilor moderne referitoare la determinismul ascuns sub o aparenţă haotică, fie a comportării temporale a unor sisteme complexe, fie a caracteristicilor geometrice ale unor obiecte, s-a dezvoltat şi conceptul de *percolare*. Acest concept a fost introdus de matematicianul J.M Hammersley şi inginerul S.R. Broadbend, în legătură cu fenomenul de filtrare a aerului printr-o mască de gaze. Cei doi cercetători urmăreau să stabilească în ce condiţii o astfel de mască devine inutilizabilă prin colmatarea porilor săi, în speţă, la ce procentaj de pori blocaţi funcţia de filtrare nu se mai poate realiza. Ulterior s-a făcut analogia cu fenomenul de răspândire a unei epidemii într-o populaţie (de exemplu un parazit într-o livadă) şi cu cel de răspândire a focului într-o pădure. În majoritatea cazurilor se urmărea o estimare cantitativă a pragului de realizare a fenomenului în vederea controlării lui.

Semnificativ este faptul că structurile la nivelul cărora se înregistrează fenomenul de percolare par să aibă caracteristici geometrice *fractale* sau, cum se mai poate spune, să prezinte aceleaşi caracteristici geometrice indiferent de scara

la care se efectuează observarea lor. În cazul reţelei de canalicule ce se poate asocia porilor ramificaţi ai unei structuri membranare macroscopice, estimarea caracterului fractal, chiar dacă nu oferă posibilitatea unei descrieri matematice cantitative, lasă loc totuşi acceptării unei predictibilităţi limitate a traseelor disponibile pentru transportul ionilor, apei şi altor molecule mici. De remarcat că acelaşi *caracter fractal* se atribuie şi organizării intime a *ţesutului pulmonar.*



CAPITOLUL 11

Biofizica bioelectrogenezei celulare

Prin bioelectrogeneză se înţelege fenomenul complex, omniprezent în structurile materiei vii, prin care este generată o diferenţă de potenţial electric, cu rol de asigurare a unei stări electrice caracteristice (potenţiale electrice de repaus) sau de modificare a stării electrice de repaus ca urmare a acţiunii unor stimuli (potenţiale de acţiune).

Caracterizarea stării electrice a unor celule, ţesuturi sau organe, impune identificarea unor parametri electrici de tip capacitiv, disipativ (rezistiv), inductiv şi studiul dependenţei lor de starea fiziologică precum şi de alţi parametri fizico-chimici (pH, grad de ionizare, etc.).

Un organism viu se comportă ca un conductor de ordinul II (ionic), neomogen şi anizotrop, căci distribuţia volumică de sarcini electrice elementare este neuniformă în timp şi de-a lungul direcţiilor spaţiale de referinţă.

Bioelectrogeneza celulară este determinată în principal de asimetria distribuţiei ionice de o parte şi de alta a membranei

celulare (plasmalema), între cauzele determinante ale acestei asimetrii electrice se numărându-se în primul rând:

- concentraţiile diferite de ioni mici de la nivelul celor două feţe ale membranei, mai ales a cationilor mici (Na^+, K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}) aflaţi atât în mediul extracelular cât şi în mediul intracelular;
- prezenţa anionilor macromoleculari, nedifuzibili, din mediul intracelular;
- prezenţa la exteriorul membranelor a unor concentraţii semnificative de resturi anionice de molecule de acid sialic care aparţin terminaţiilor glucidice ale unor glicoproteine din structura membranei.

Faţa externă ca şi cea internă a membranei celulare prezintă o încărcare electrică permanentă, caracterizată de potenţiale electrice diferite la exteriorul (V_e) şi respectiv la interiorul (V_i) celulei. În principiu ambele potenţiale sunt negative dar inegale astfel că şi potenţialul electric de membrană, care se măsoară de la interior spre exterior, este şi el, prin convenţie, negativ:

$$\begin{aligned} V_e < 0, V_i < 0 \\ V = V_i - V_e < 0 \end{aligned} \qquad (71)$$

căci între valorile absolute ale potenţialelor V_e şi V_i există relaţia:

$$|V_e| > |V_i| \quad (72)$$

În cazul celulelor excitabile (celulele musculare, nervoase, vizuale) potenţialul electric de membrană poate să varieze foarte mult în timpul acţiunii stimulilor specifici, când apar aşa numitele potenţiale de acţiune - variaţii ale potenţialelor de repaus care pot fi depolarizări sau hiperpolarizări electrice ale membranei.

11.1.Modele electrice pentru membrana excitabilă

Pentru modelarea proprietăţilor electrice ale membranei celulare s-au propus diferite variante de circuite electrice, bazate, în principal, pe elemente capacitive şi elemente rezistive de circuit. Elementele capacitive reflectă proprietăţile de izolator electric conferite de bistratul lipidic în timp ce elementele disipative de energie (rezistive) descriu proprietăţile de permeabilitate ale membranei pentru ioni, permeabilitate al cărei suport molecular îl constituie agregatele proteice de tipul

canalelor şi pompelor ionice precum şi porii membranari. Existenţa dublului strat de sarcini electrice - prin convenţie pozitive la exteriorul membranei şi negative în interior - datorită căruia există componenta electrică a gradientului de potenţial electrochimic, permite analogia cu acţiunea unei surse de tensiune electromotoare în circuitul electric echivalent al membranei.

Aşadar, pentru unitatea de suprafaţă a membranei, avem un circuit echivalent de forma (Figura 49):

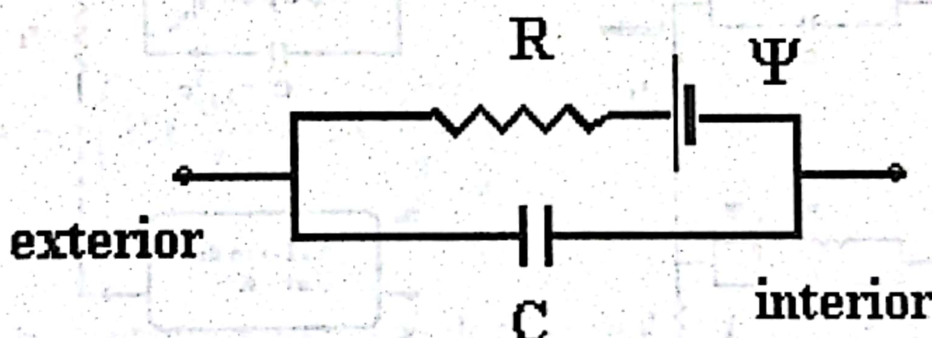


Figura 49. - Proprietăţile electrice ale unităţii de suprafaţă a membranei excitabile (modificat după F. Gremy şi J. Perrin 1975)

unde: *valoarea capacităţii* este de circa 1 $\mu F/cm^2$, *valoarea rezistenţei* pe unitatea de lungime este de circa 1000 Ωcm^2 iar *potenţialul de repaus* al membranei, Ψ, este cuprins între 50mV şi - 90 mV.

În mod similar, proprietăţile conductoare de electricitate ale mediului interior precum şi ale celui exterior celulei sunt reprezentate schematic prin rezistenţele unităţii de lungime, $\mathbf{r_i}$ şi $\mathbf{r_e}$.

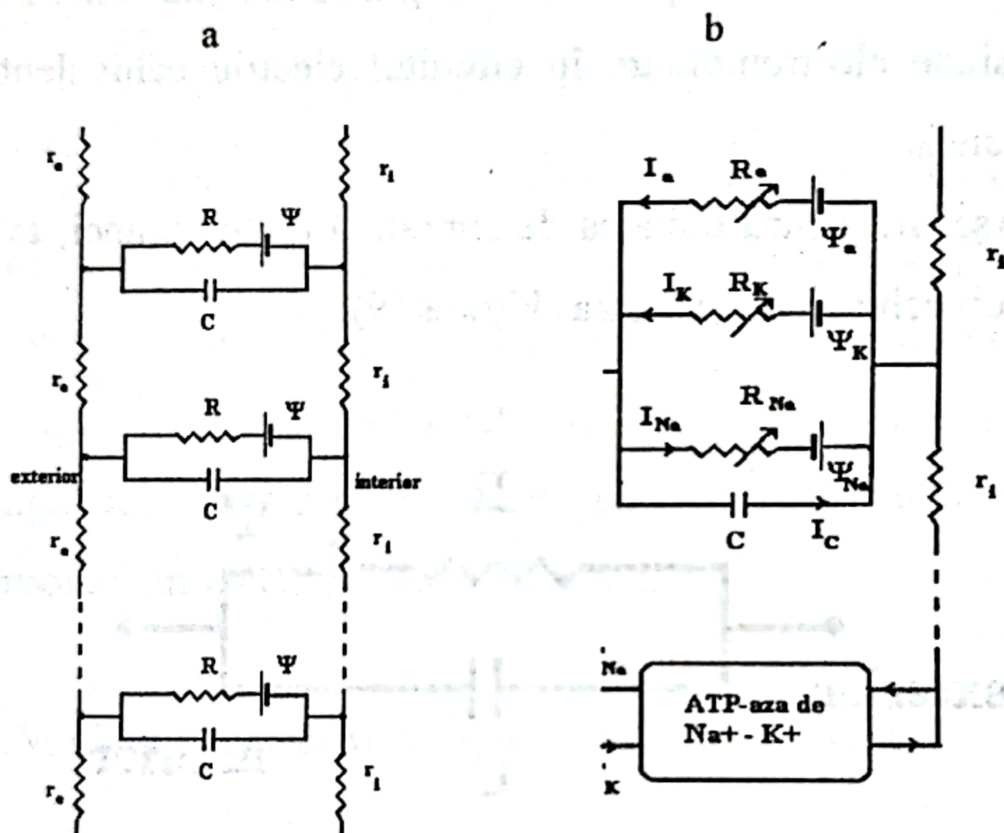


Figura 50. - Scheme electrice echivalente pentru proprietăţile electrice capacitive şi rezistive ale membranei unei celule excitabile ; **a** - proprietăţile capacitive şi rezistive constante, în aproximaţia transportului ionic exclusiv pasiv; **b** - proprietăţile capacitive şi rezistive variabile, în aproximaţia independenţei transportului pasiv de sodiu, potasiu şi alţi ioni precum şi în ipoteza transportului activ de sodiu şi potasiu (F. Gremy şi J. Perrin 1975)

Membrana axonală a celei mai reprezentative celule excitabile, celula neuronală, poate fi astfel reprezentată printr-o

serie de unităţi repetitive cu proprietăţi electrice disipative (rezistive), capacitive şi respectiv generatoare de diferenţă de potenţial electric (Figura 50).

11.2. Potenţialul de difuzie

Fluxul, **f**, de ioni caracterizaţi de sarcina electrică **z** şi mobilitatea **m**, este determinat de gradientul de concentraţie **dC/dx** şi de gradientul de potenţial electric **dΨ/dx**, caracteristice membranei străbătute:

$$f = -m\left(RT\frac{dC}{dx} + zFC\frac{d\Psi}{dx}\right) \quad (73)$$

unde: **R** este constanta gazelor perfecte, **T** este temperatura absolută, **F** este constanta lui Faraday. Pentru potenţialul de membrană evaluat teoretic va fi utilizată notaţia **Ψ** iar pentru cel real, măsurabil experimental, notaţia **V**. Odată ce un număr de ioni a trecut dintr-un compartiment în altul, se modifică gradientul de concentraţie (se reduce) ca şi distribuţia de sarcină electrică şi deci şi gradientul electric. La echilibru fluxul se anulează şi avem:

$$\frac{d\Psi}{dx}=\frac{RT}{zFC}\frac{dC}{dx}=\frac{RT}{zF}\frac{d(\ln C)}{dx} \qquad (74)$$

Integrând între două puncte ce limitează grosimea ***l*** a membranei obţinem ecuaţia lui Nernst:

$$\Delta\Psi=\frac{RT}{zF}\ln\frac{C_1}{C_2} \qquad (75)$$

unde: $\Delta\Psi$ este Ψ_2-Ψ_1 între cele două puncte de pe o faţă şi de pe cealaltă a membranei.

Dacă prin membrană difuzează (Figura 51) şi cationi şi anioni atunci condiţia de echilibru implică anularea fluxului rezultant al celor două fluxuri. Fie ***l*** grosimea membranei şi fie $[i^-(0)]$, $[i^-(l)]$, $[i^+(0)]$, $[i^+(l)]$ valorile concentraţiilor de anioni (de exemplu Cl^-) şi respectiv cationi (de exemplu Na^+) în **x=0** şi în **x=*l*,** sau, pentru un tip oarecare de ioni, fie aceste concentraţii $[C(0)]$ şi $[C(l)]$.

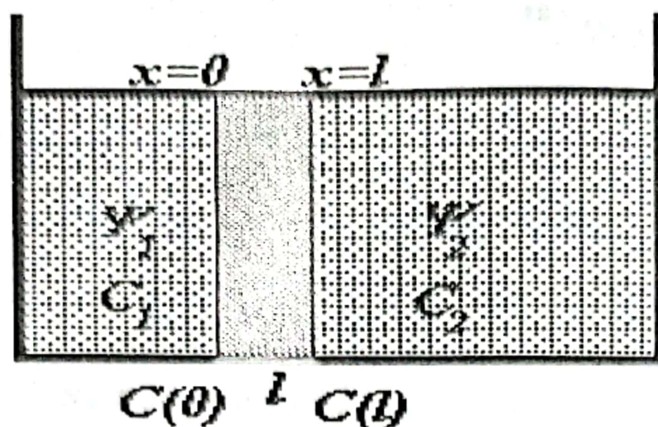


Figura 51. - Sistem cu două compartimente, cu concentraţiile ionice C_1 şi C_2 şi potenţialele electrice Ψ_1 şi Ψ_2 separate de o membrană de grosime l (după J. Darnell)

Dacă notăm:

$$b = \frac{-f}{mRT}, a = \frac{zF}{RT}\frac{d\Psi}{dx} \tag{76}$$

atunci: pentru dependenţa concentraţiei de distanţa de difuzie se obţine, indiferent de tipul de ioni urmărit:

$$\frac{dC(x)}{dx} + aC(x) = b \tag{77}$$

rezultă o ecuaţie diferenţială neomogenă de ordinul întâi, care, prin integrare, duce la:

$$C(x) = \frac{b}{a} + ct.e^{-ax} \quad (78)$$

unde: **ct.** este constanta de integrare. Din condiţiile iniţiale şi introducând o nouă notaţie simplificatoare, $C_{l,0}$ obţinem:

$$b = a\frac{[C(l)] - [C(0)]e^{-al}}{1 - e^{-al}} = aC_{l,0} \quad (79)$$

Reconsiderând notaţiile **a** şi **b** rezultă:

$$f = -mzFC_{l,0}\frac{d\Psi}{dx} \quad (80)$$

Revenind la cazul moleculei de NaCl disociată în ioni în mediu apos, de exemplu, vom avea:

$$f_{i^+} = -m_{i^+}F\left[i^+_{l,0}\right]\frac{d\Psi}{dx}$$
$$f_{i^-} = -m_{i^-}F\left[i^-_{l,0}\right]\frac{d\Psi}{dx} \quad (81)$$

unde: notaţiile $[i^+_{l,0}]$ şi $[i^-_{l,0}]$ sunt particularizări ale notaţiei $C_{l,0}$ pentru anionii şi respectiv cationii difuzibili. Din egalitatea cu zero a fluxului rezultant rezultă:

$$e^{a l} = \frac{m_{i^+}\left[i_0^+\right] - m_{i^-}\left[i_l^-\right]}{m_{i^+}\left[i_l^+\right] - m_{i^-}\left[i_0^-\right]} \qquad (82)$$

adică: în aproximaţia unei variaţii liniare a potenţialului electric în membrana de grosime l (grosimea membranei se reduce de la numitorii egalităţii următoare):

$$\frac{d\Psi}{dx} = \frac{\Delta\Psi}{l} = \frac{RT}{Fl}\ln\frac{m_{i^+}\left[i_0^+\right] - m_{i^-}\left[i_l^-\right]}{m_{i^+}\left[i_l^+\right] - m_{i^-}\left[i_0^-\right]} \qquad (83)$$

Dacă există mai multe tipuri de cationi şi mai multe tipuri de anioni monovalenţi atunci:

$$\Delta\Psi = \frac{RT}{F}\ln\frac{\sum\limits_{\alpha} m_{\alpha i^+}\left[i_{\alpha 0}^+\right] - \sum\limits_{\beta} m_{\beta i^-}\left[i_{\beta l}^-\right]}{\sum\limits_{\alpha} m_{\alpha i^+}\left[i_{\alpha l}^+\right] - \sum\limits_{\beta} m_{\beta i^-}\left[i_{\beta 0}^-\right]} \qquad (84)$$

unde: α şi β sunt indici de sumare pentru tipurile de cationi şi respectiv de anioni. Particularizând pentru o membrană biologică, prin care difuzează două tipuri principale de cationi

monovalenţi, Na^+ şi K^+ precum şi un tip de anion monovalent, Cl^-, din relaţia de mai sus se obţine potenţialul de membrană:

$$\Delta\Psi = \frac{RT}{F}\ln\frac{P_{K^+}[K^+]_1 + P_{Na^+}[Na^+]_1 + P_{Cl^-}[Cl^-]_2}{P_{K^+}[K^+]_2 + P_{Na^+}[Na^+]_2 + P_{Cl^-}[Cl^-]_1} \qquad (85)$$

unde s-au introdus permeabilităţile membranei pentru ionii difuzibili, P_{K+}, P_{Na+} şi P_{Cl-}

$$P_{Na^+} = \frac{z_{Na^+} K_{mNa^+} RTm_{Na^+}}{l}$$
$$P_{K^+} = \frac{z_{K^+} K_{mK^+} RTm_{K^+}}{l} \qquad (86)$$
$$P_{Cl^-} = \frac{z_{Cl^-} K_{mCl^-} RTm_{Cl^-}}{l}$$

Indicii **1** şi **2** corespund interiorului şi respectiv exteriorului membranei. Sarcinile electrice ionice sunt egale cu unitatea (diferă doar semnul) iar K_{mNa+}, etc. sunt coeficienţi de partiţie a concentraţiilor ionice între membrană şi spaţiul intra sau extracelular, consideraţi, pentru simplificare, egali cu unitatea (concentraţia fiecărui tip de ioni este nemodificată la trecerea din spaţiul exterior membranei la porţiunea de

membrană imediat adiacentă, adică gradientul de concentraţie este strict localizat pe grosimea membranei).

Coeficienţii de difuzie, **D**, se pot regăsi în forma produselor dintre factorul **RT** şi mobilităţile fiecărui tip de ioni prin membrana considerată:

$$\begin{aligned} D_{Na^+} &= RTm_{Na^+} \\ D_{K^+} &= RTm_{K^+} \\ D_{Cl^-} &= RTm_{Cl^-} \end{aligned} \qquad (87)$$

Evaluările experimentale efectuate cu ajutorul izotopilor radioactivi pentru urmărirea fluxurilor ionice, ca şi măsurătorile electrice directe realizate cu ajutorul electrozilor intracelulari, au dat valori de -50 mV până la -90 mV pentru potenţialul de membrană la diferite tipuri de biomembrane.

11.3. Echilibrul Donnan

În cazul membranelor celulare precum şi în cazul altor biomembrane din organismele animale (epiteliul intestinal, pereţii vaselor sangvine, membranele alveolelor pulmonare, ş.a.) există o modificare semnificativă a echilibrului ionilor mici, determinată de prezenţa ionilor macromoleculari,

nedifuzibili, rezultaţi din disocierea unor particule coloidale de natură proteică, etc. (I. Haulică şi col. 1984; I. Haulică şi col. 1992; I. Haulică şi col. 1998).

Adesea este vorba de *anioni nedifuzibili* care aparţin doar unuia dintre cele două compartimente ale modelului bicompartimental cu membrane semipermeabile, discutat anterior.

Dacă numai în primul compartiment, există anioni nedifuzibili, cu **n** sarcini elementare fiecare, în concentraţie de $[P^-]_1$ iar concentraţiile de anioni şi cationi mici *monovalenţi* din cele două compartimente sunt $[a^-]_1$, $[c^+]_1$, $[c^+]_2$, atunci neutralitatea electrică a fiecărui compartiment se transpune cantitativ astfel:

$$\begin{aligned} [c^+]_1 &= [a^-]_1 + n[P^-]_1 \\ [c^+]_2 &= [a^-]_1 \end{aligned} \qquad (89)$$

Condiţiile ca la echilibru să se anuleze fluxurile de cationi şi anioni mici conduc la expresiile potenţialului de membrană:

$$\Delta\Psi = \frac{RT}{F} \ln \frac{[c^+]_1}{[c^+]_2} \quad (90)$$

$$\Delta\Psi = \frac{RT}{F} \ln \frac{[c^-]_2}{[c^-]_1} \quad (91)$$

de unde rezultă: *ecuaţia Donnan*:

$$[c^+]_1 \cdot [c^-]_1 = [c^+]_2 \cdot [c^-]_2 \quad (92)$$

În cele prezentate este luat în consideraţie numai transportul pasiv al ionilor, formulele obţinute referindu-se la *potenţialul de repaus* (în lipsa acţiunii unor stimuli asupra unor celule excitabile)

11.4. Potenţialul de acţiune neuronal

Generarea *potenţialului de acţiune* – la nivelul membranei neuronale cuprinde ansamblul modificărilor suferite de potenţialul electric de membrană , sub influenţa unui stimul umoral (depolarizarea acetilcolinică a membranei postsinaptice) sau electric, de intensitate superioară pragului de excitaţie. In dezvoltarea lui, excitarea se realizează între două puncte

apropiate, printr-un microelectrod (cu arie foarte mică, *'punctiformă'* a secţiunii transversale) şi un electrod de suprafaţă (cu arie relativ mare faţă de electrodul ' punctiform') între care se aplică un puls rectangular de tensiune electrică, V_E - V_S. Între acelaşi electrod de suprafaţă şi un alt microelectrod plasat în imediata lui apropiere se recepţionează variaţia de tensiune V_S - V_A generată de celula neuronală - măsură directă a potenţialului electric de acţiune a membranei sale. Se obţine un răspuns electric de formă caracteristică la care se disting mai multe faze (Figura 52). Întâi este recepţionat un *prepotenţial* (porţiunea de curbă notată *ab*), apoi se înregistrează aşa numitul *spike* (*bcd*) - variaţia cea mai amplă din cadrul acestui fenomen care este urmat de un postpotenţial negativ (*de*) şi un postpotenţial pozitiv (*ef*). Cel mai adesea potenţialul de acţiune este în principal o depolarizarea electrică a membranei, dar la unele celule vizuale poate fi în principal o hiperpolarizare.

Prepotenţialul este o variaţie locală a potenţialului de repaus care precede apariţia spike-ului. În funcţie de sensul şi intensitatea curentului electric de excitaţie, **I**, potenţialul de membrană poate suferi o variaţie mai mare sau mai mică, de accentuare sau diminuare a stării de polarizare electrică caracteristică repausului (lipsei excitaţiei), care constituie

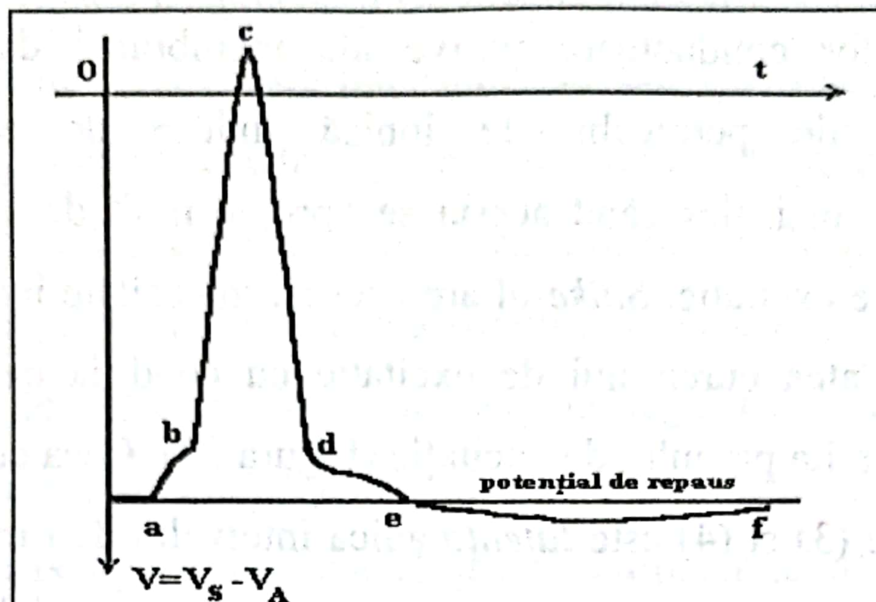


Figura 52.- Forma generală a unui potenţial de acţiune: *prepotenţial* (*ab*), *spike* -ul (*bcd*), postpotenţialul negativ (*de*) şi postpotenţial pozitiv (*ef*) (modificat după F. Gremy şi J. Perrin 1975)

prepotenţialul şi care nu este urmată de *spike* dacă nu se depăşeşte pragul de excitaţie. Astfel în cazul (1) potenţialul de membrană suferă o accentuare a polarizării căci microelectrodul este electrodul negativ şi electrodul de suprafaţă este electrodul pozitiv - curent de excitaţie negativ. În schimb, în cazul (2), inversându-se polaritatea celor doi electrozi, curentul de excitaţie este pozitiv şi potenţialul de membrană este diminuat dar nu apare şi un *spike*, excitaţia fiind sub nivelul pragului. Abia în cazurile (3) şi (4), curenţi de acelaşi sens cu (2) dar de intensitate egală şi respectiv mai mare decât cea a pragului, induc depolarizări de membrană care conţin un prepotenţial şi un *spike*. Sunt motive să se presupună

că generarea prepotenţialului nu este numai o manifestare a proprietăţilor conductoare pasive ale membranei dar şi a variaţiilor de permeabilitate ionică induse de acţiunea stimulului, mai ales când acesta se apropie mult de valoarea pragului de excitaţie. *Spike*-ul are aceeaşi intensitate indiferent de intensitatea curentului de excitaţie cu condiţia ca să fie depăşită limita pragului de excitaţie (Figura 53). Ceea ce diferă în cazurile (3) şi (4) este *latenţa* adică intervalul de timp după care se înregistrează componenta principală a potenţialului de acţiune - *spike*-ul. La o intensitate mai mare a excitaţiei, latenţa este mai scurtă şi invers.

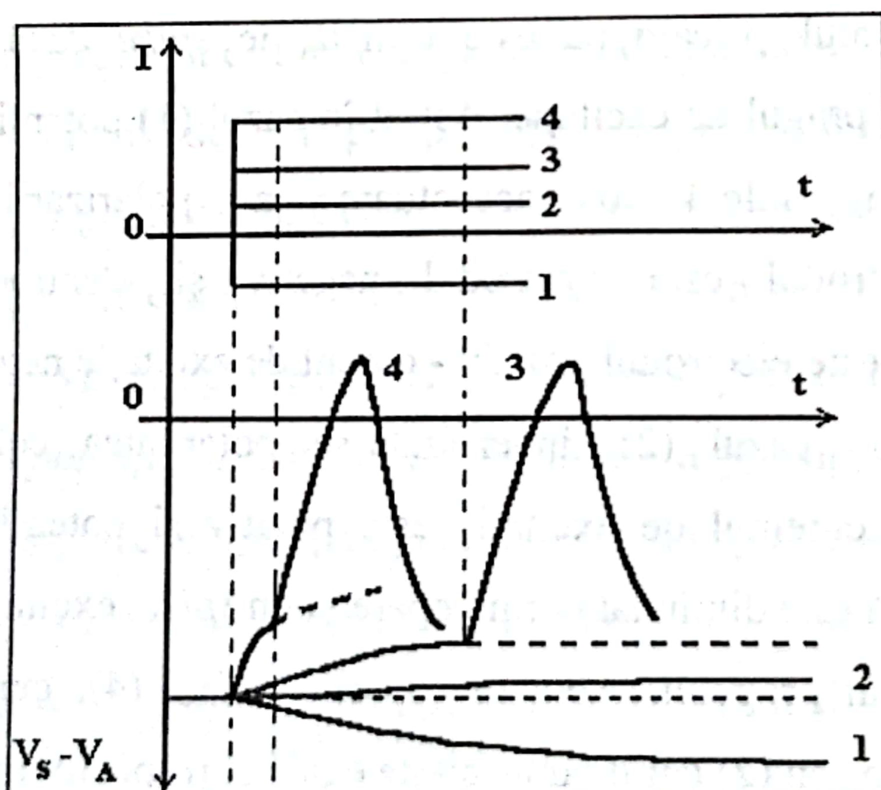


Figura 53 - Curenţii de excitaţie *I (t)* şi potenţialele de membrană induse *V(t)* (după F. Gremy şi J. Perrin 1975)

Potenţialul de acţiune propriu-zis, *spike-ul,* reprezintă variaţia rapidă de potenţial de membrană care se produce sub acţiunea unui stimul de intensitate suficient de mare pentru a depăşi pragul de excitaţie. Amplitudinea acestei variaţii poate să însemne chiar o inversare a sensului polarităţii membranei. Ea nu depinde de intensitatea stimulului, dacă acesta a depăşit pragul de excitaţie, deci se supune legii *totul sau nimic.*

Postpotenţialul este considerat ca rezultanta a două faze, un postpotenţial de acelaşi sens cu potenţialul de acţiune propriu-zis şi un potenţial de sens opus care are o durată mai mare. Amplitudinea primei faze poate avea valori de la câţiva milivolţi în axonul gigant al calmarului (axon nemielinizat) până la câteva zeci de milivolţi în fibra musculară, în fibra miocardică fiind comparabilă chiar cu cea a *spike*-ului. Durata primei faze este de ordinul zecilor de milisecunde la fibra nervoasă mielinizată şi de circa 200 milisecunde la fibra miocardică, în timp ce durata celei de-a doua faze poate atinge chiar o secundă - dar amplitudinea acesteia din urmă este, de regulă, sub 1 milivolt (mV).

11.4.1. Propagarea potenţialului de acţiune

Propagarea potenţialului de acţiune se concretizează în principal în propagarea spike-ului care realizează conducerea excitaţiei în lungul fibrei. Se consideră o fibră nervoasă nemielinizată, cum este cazul, de exemplu, la axonul gigant de calmar, material biologic foarte mult utilizat în studii de excitabilitate celulară. Stimularea experimentală se realizează cu o pereche de electrozi dintr-un circuit electric de tensiune continuă.

Mecanismul acestei propagări poate fi reprezentat prin intermediul modificărilor de distribuţie de sarcină electrică pe feţele membranei celulare ca urmare a aplicării stimulului excitant între două puncte apropiate ale acestei membrane. Astfel se consideră că excitarea locală este echivalentă cu inversarea semnului sarcinii electrice adică o inversie de potenţial electric (plus la exterior şi minus la interior (Figura 54).

Tendinţa de compensare a acestei perturbări de sarcină electrică se manifestă prin apariţia unor curenţi electrici locali şi la interiorul şi la exteriorul fibrei având rolul de diminuare a diferenţei de potenţial de membrană din zona excitată. Aceşti

curenţi sunt fluxuri de ioni mici pozitivi, prezenţi întotdeauna la ambele feţe ale membranei.

Deplasarea ionilor pozitivi de la faţa externă a membranei dinspre zonele cu încărcare pozitivă spre zona excitată, cu încărcare negativă la exteriorul membranei, produce apariţia spike-ului (când potenţialul ajunge la limita pragului de excitabilitate). Propagarea excitaţiei se produce în ambele sensuri, fără modificarea amplitudinii spike-ului (propagare fără decrement), cu o viteză cu atât mai mare cu cât diametrul fibrei nervoase este mai mare (Figura 55).

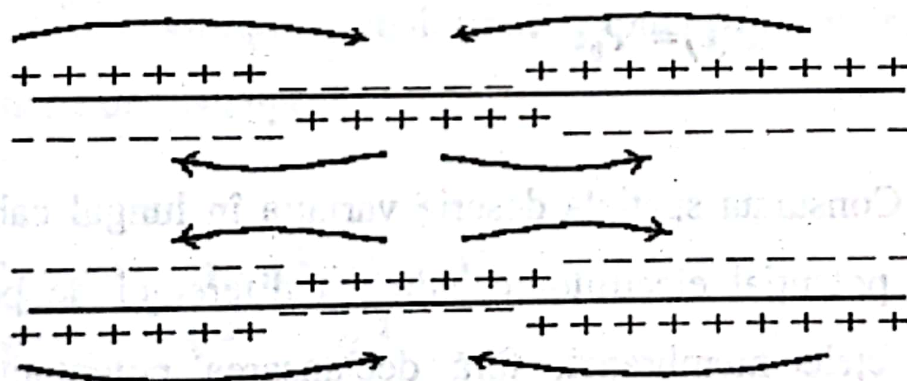


Figura 54.- Inversarea polarizării electrice a membranei excitabile determină apariţia unor curenţi de sarcini ionice pozitive care tind să compenseze perturbarea electrică produsă (modificat după F. Gremy şi J. Perrin 1975)

Teoria cablului coaxial demonstrează că proprietăţile conductoare ale acestuia (în condiţiile în care, între două puncte se aplică o diferenţă de potenţial ce nu depăşeşte pragul de

excitabilitate), depind numai de doi parametri, cunoscuţi sub denumirile de constanta de timp, τ, şi constanta spaţială, λ.

$$\tau = RC$$
$$\lambda = \sqrt{\frac{R}{r_i + r_e}} \quad (93)$$

Constanta de timp descrie variaţia în timp a potenţialului de membrană dintr-un punct considerat, faţă de valoarea de la un anumit moment iniţial, pe durata propagării electrotonice a curentului generat de diferenţa de potenţial aplicată:

$$\Psi(t) = \Psi_0 e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (94)$$

Constanta spaţială descrie variaţia în lungul cablului a acestui potenţial electrotonic, adică a diferenţei de potenţial dintre feţele membranei, fără declanşarea potenţialului de acţiune, faţă de un punct considerat iniţial:

$$\Delta\Psi(x) = \Delta\Psi_0 e^{-\frac{x}{\lambda}} \quad (95)$$

Dacă aplicarea pulsului de tensiune stimulator se efectuează la momentul **t=0**, atunci în acest moment diferenţa

de tensiune între două puncte separate prin distanţa **dx** este dată de curentul transmembranar şi rezistenţele pasive corespunzătoare celor două feţe ale membranei (după Hughes 1979, citat de V. Gheoghe şi A. Popescu 1990):

$$I_M = \frac{1}{R_e + R_i} \frac{d^2\Psi_M}{dx^2} \qquad (96)$$

Ecuaţia undelor cu propagare unidimensională (pe o direcţie OX) poate descrie destul de bine propagarea excitaţiei, după cum au arătat măsurătorile experimentale în comparaţie cu valorile obţinute computaţional, unde potenţialul de membrană este o funcţie de distanţă şi timp.:

$$\frac{d^2\Psi(x,t)}{dx^2} = \frac{1}{v^2} \frac{d^2\Psi(x,t)}{dt^2} \qquad (97)$$

Descrierea cantitativă a circulaţiei ionilor mici prin membrana axonală în timpul generării şi propagării potenţialului de acţiune (excitaţia sau impulsul electric care depăşeşte pragul de excitaţie) , se poate face cu ajutorul legilor de bază ale circuitelor electrice (legile lui Ohm).

Astfel, în *modelul lui Hodgkin şi Huxley*, pentru fiecare din cele trei categorii de ioni se pot scrie relaţiile de legătură între intensităţile curenţilor pasivi (**I**) şi diferenţele de tensiune electrică generatoare (**Ψ**):

$$I_{Na} = \frac{\Psi - \Psi_{Na}}{R_{Na}}, I_K = \frac{\Psi - \Psi_K}{R_K}, I_a = \frac{\Psi - \Psi_a}{R_a} \quad (98)$$

unde: **Ψ** este potenţialul de membrană, iar R_{Na}, R_K, R_a sunt rezistenţele membranei pentru fiecare categorie de ioni.

Curentul ionic total prin membrană, I_M, are şi o componentă capacitivă:

$$I_M = C_M \frac{d\Psi}{dt} + I_{Na} + I_K + I_a$$
$$I_M = C_M \frac{d\Psi}{dt} + \frac{\Psi - \Psi_{Na}}{R_{Na}} + \frac{\Psi - \Psi_K}{R_K} + \frac{\Psi - \Psi_a}{R_a} \quad (99)$$

Pentru caracterizarea variabilităţii rezistenţei electrice în funcţie de potenţialul de membrană s-au propus mai multe variante dintre care, cea care descrie, *formal*, cel mai bine acest fenomen - în cea mai bună concordanţă cu datele experimentale - este redată mai jos (se preferă conductanţa, **g**, adică inversul rezistenţei, pentru a da o imagine mai sugestivă proprietăţilor

de permeabilitate membranară). Curentul prin membrană va fi atunci de forma:

$$I_M = C_M \frac{d\Psi}{dt} + g_{Na}(\Psi - \Psi_{Na}) + g_K(\Psi - \Psi_K) + g_a(\Psi - \Psi_a) \quad (100)$$

Pentru *sodiu* sunt propuse ecuaţiile:

$$g_{Na}(t) = g_{Na}^0 m^3(t) h(t)$$
$$\frac{dm}{dt} = \alpha_m (1 - m) - \beta_m m \quad (101)$$
$$\frac{dh}{dt} = \alpha_h (1 - h) - \beta_h h$$

unde: **m(t)** şi **h(t)** sunt funcţii exponenţiale temporale la un potenţial dat, după cum rezultă din integrarea ecuaţiilor diferenţiale (D. G. Mărgineanu, 1976), iar α_m, α_h, β_m şi β_h sunt constantele de viteză corespunzătoare variaţiilor funcţiilor **m(t)** şi **h(t)** care, la un potenţial fixat, au valori constante. Valoarea maximă a conductanţei pentru sodiu este notată g_{Na}^0.

Pentru *potasiu* este dată o relaţie ce depinde de o altă funcţie temporală, **n(t):**

$$g_K(t) = g_K^0 n^4(t)$$
$$\frac{dn(t)}{dt} = \alpha_n(1-n) - \beta_n n \qquad (102)$$

Constantele de viteză α_n şi β_n corespund variaţiei în timp a funcţiei **n(t)** şi, la o concentraţie dată de ioni de calciu, precum şi la o temperatură dată, depind numai de potenţialul electric de membrană.

Parametrii **m(t), h(t), n(t)** pot fi consideraţi ca descriind acţiunea unor factori neprecizaţi ca natură, ce controlează activarea canalelor ionice de Na (parametrul **m**), de K (parametrul **n**) şi respectiv inactivarea canalelor de Na (parametrul **h**).

De exemplu, deschiderea canalului pentru K^+ ar putea fi condiţionată de prezenţa a patru sarcini electrice negative elementare, purtate de particule ipotetice, mobile sub acţiunea câmpului electric. În aceste condiţii, **n(t)** ar avea semnificaţia fizică a probabilităţii ca prezenţa uneia din cele patru sarcini să condiţioneze independent deschiderea canalului de potasiu, $n^2(t)$ ar fi probabilitatea ca această activare să fie condiţionată de prezenţa a două sarcini electrice negative, etc.

Într-o interpretare bazată pe simetrie, $n^2(t)$ ar putea avea semnificaţia probabilităţii, ca activarea canalului de potasiu să

fie controlată de absenţa din apropierea suprafeţei membranare a unui ion bivalent pozitiv (de ex.: ionul de calciu).

În cazul ionului de sodiu, în mod analog, se poate presupune că activarea este declanşată de prezenţa a trei sarcini electrice elementare astfel că parametrul **h(t)** dobândeşte semnificaţia probabilităţii ca în apropierea canalului să se afle una din aceste particule.

Pentru celelalte tipuri de ioni (cum ar fi clorul ş.a.) conductanţa, g_a, este presupusă constantă.

Dependenţa de timp a intensităţii curentului ionic prin membrană apare ca o relaţie de parametrii **m, n, h** care modulează conductanţele ionice pentru sodiu şi potasiu:

$$I_M(t)=C_M\frac{d\Psi}{dt}+(\Psi-\Psi_{Na})g^0_{Na}m^3(t)h(t)+(\Psi-\Psi_K)g^0_K n^4(t)+(\Psi-\Psi_a)g_a \quad (103)$$

Acest model conduce la graficul de variaţie în timp a potenţialului de membrană precum şi a conductanţelor ionice pentru sodiu şi potasiu, ca rezultat al integrării ecuaţiilor diferenţiale propuse.

Limitele acestui model, sugerate chiar de aproximaţiile în care este formulat, decurg şi din necesitatea de a preciza mecanismele de activare a diferitelor tipuri de canale ionice

precum şi din restricţia, ca fiecare tip de ion să circule prin canal separat (în realitate existând şi canale ionice pentru două tipuri de ioni).

Luând în considerare şi rezultatele teoriei cablului coaxial, *modelul Hodgkin şi Huxley* , poate descrie variaţia temporară a potenţialului de membrană într-un punct considerat, ca urmare a acţiunii unui stimul care depăşeşte pragul de excitabilitate (Figurile 56 şi 57):

$$\frac{1}{(R_e+R_i)}\frac{d^2\Psi}{dt^2}=C_M\frac{d\Psi_M}{dt}+(\Psi-\Psi_{Na})g^0_{Na}m^3(t)h(t)+(\Psi-\Psi_K)g^0_K n^4(t)+(\Psi-\Psi_a)g_a \tag{104}$$

11.5. Fluxuri ionice şi electrogeneză în fibra musculară

11.5.1. Potenţialul de acţiune în fibra musculară cardiacă şi netedă

În cazul fibrei musculare cardiace apariţia potenţialului de acţiune este legată de modificarea fluxurilor ionice de potasiu, sodiu şi calciu.

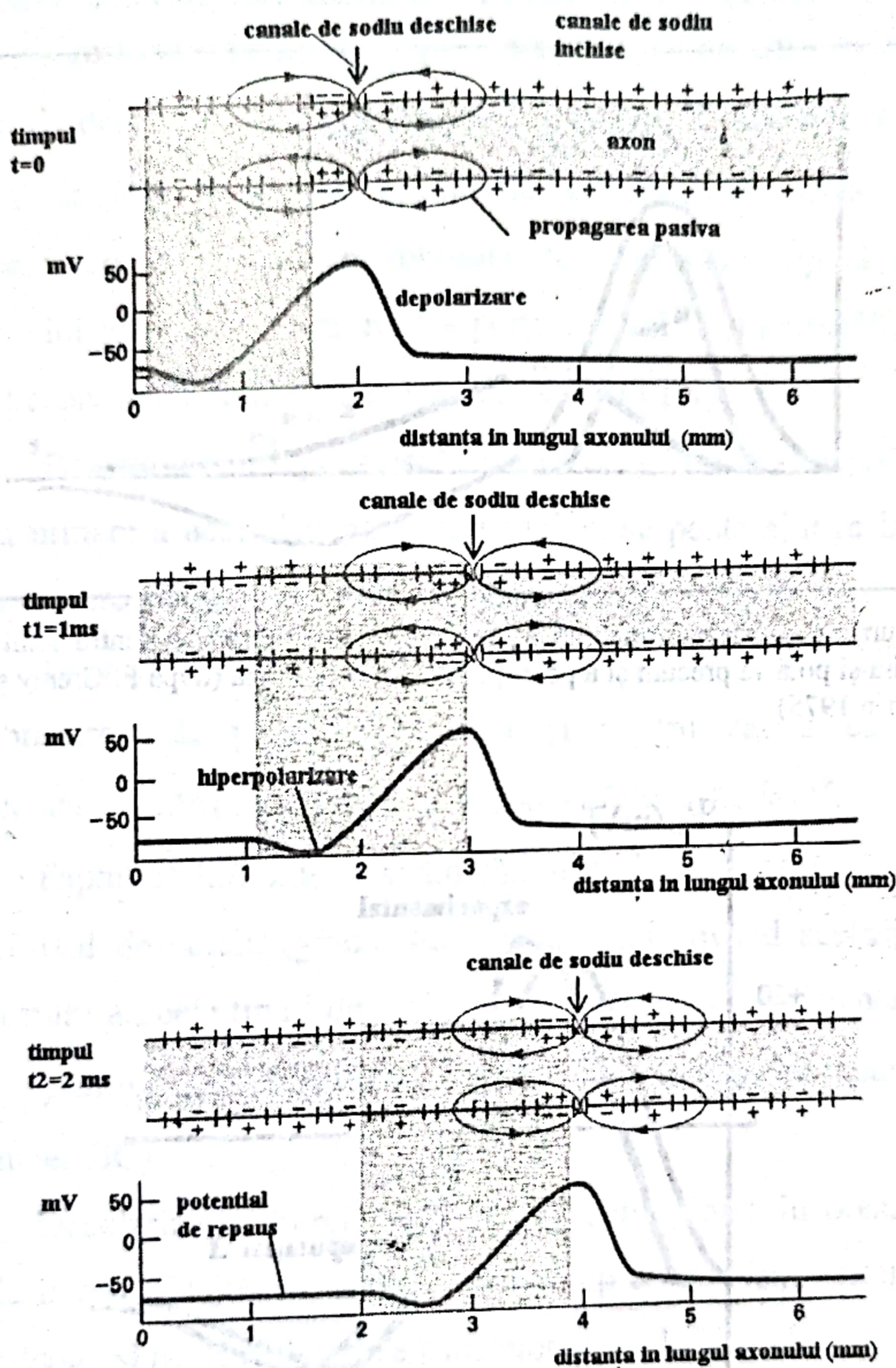


Figura 55. - Canale de sodiu dependente de voltaj ce permit propagarea unidirecţională a potenţialului de acţiune (J. Darnell şi col. 1990)

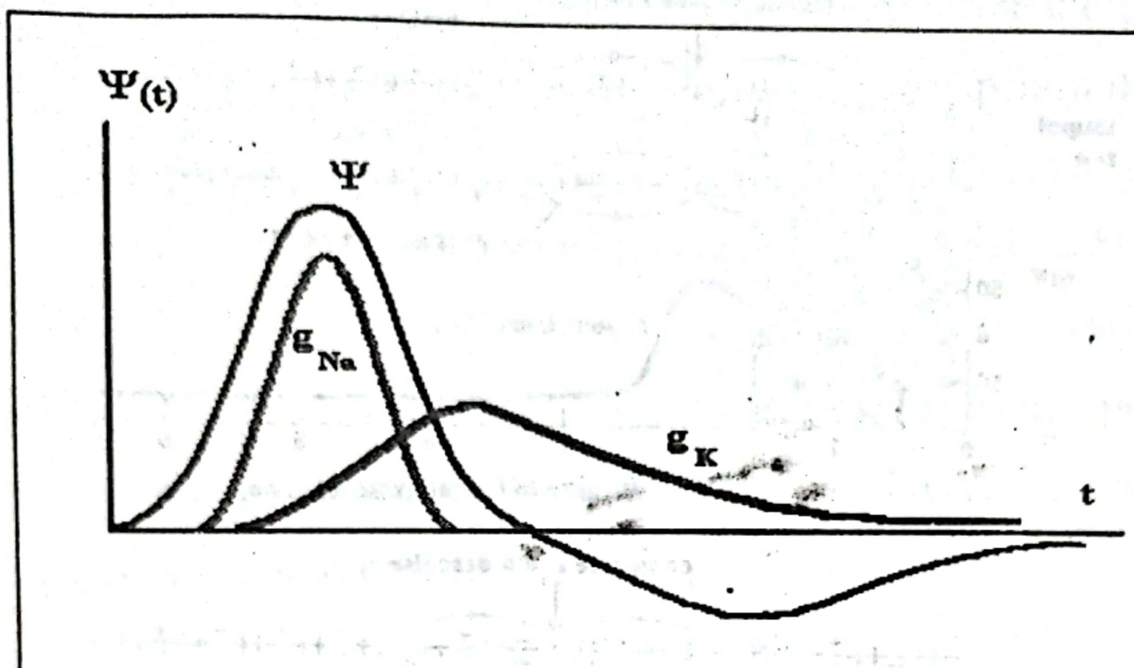


Figura 56. - Variaţia în timp a conductanţei membranare pentru ionii de sodiu şi potasiu precum şi a potenţialului de membrană (după F. Gremy şi J. Perrin 1975)

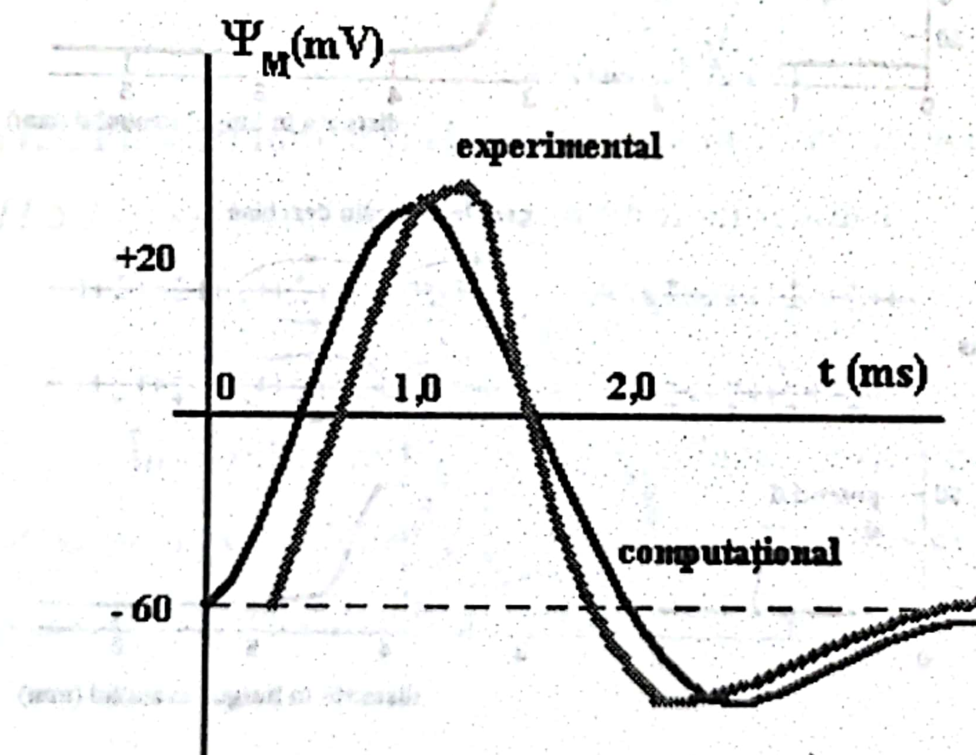


Figura 57. - Variaţia temporară a potenţialului de membrană (după F. Gremy şi J. Perrin 1975)

Creşterea permeabilităţii membranei pentru sodiu respectiv deschiderea *'canalului rapid de sodiu'* ,determină un influx de ioni de sodiu în celulă, ceea ce înseamnă o depolarizare electrică a membranei şi o creştere rapidă a curentului ionic prin membrană - porţiunea AB - (Figura 58). Acest canal poate fi inhibat de tetrodotoxină (TTX).

Potenţialul de repaus are valoarea de – 70 sau -90 mV, iar ca urmare a acestei depolarizări rapide, se poate ajunge la valoarea zero sau chiar la valori pozitive.

Ulterior, creşterea în continuare a permeabilităţii membranare atât pentru sodiu cât şi pentru calciu este consecinţa activării aşa numitului *'canal calciu-sodic lent'*.

Faptul că influxul de sodiu continuă şi este suplimentat de influxul de calciu (gradientul electrochimic având acelaşi sens pentru ambele tipuri de ioni), se concretizează în existenţa unui *'platou'* al intensităţii curentului transmembranar (porţiunea BC).

Depolarizarea fibrei cardiace este determinată în acest caz de intrarea în joc a canalelor ionice rapide de Na - voltaj dependente, şi pe de altă parte a canalelor lente de Na - Ca.

Creşterea concentraţiei calciului în citoplasmă este dată şi de eliberarea sa din rezervele intracelulare aflate la nivelul

reticulului sarcoplasmic (RS). Acesta reprezintă semnalul pentru declanşarea contracţiei musculare (sistola mecanică) ,pe toată durata platoului.

Intrarea în acţiune a pompelor ionice cauzează diminuarea curentului ionic de intrare în celulă, simultan cu cea de-a treia modificare de permeabilitate membranară: deschiderea retardă a unor canale de potasiu, adică generarea unui eflux de potasiu către exteriorul celulei.

Aceasta se traduce printr-o diminuare a curentului total (porţiunea CD) şi o repolarizare electrică rapidă a membranei şi printr-o relaxarea fibrei musculare cardiace.

Dacă variaţiile de potenţial electric a membranei celulei musculare se pot măsura direct prin tehnicile bazate pe electrozi intracelulari (clamp volatage, etc.), ceea ce se captează cu ajutorul microelectrozilor plasaţi la suprafaţa membranei este rezultatul potenţialelor de membrană generate în diferite etape ale contracţiei musculaturii cardiace, propagate la nivel cutanat. Un traseu electrocardiografic prezintă unde bipolare şi se caracterizează prin următoarele componente numite unde (Figura 59):

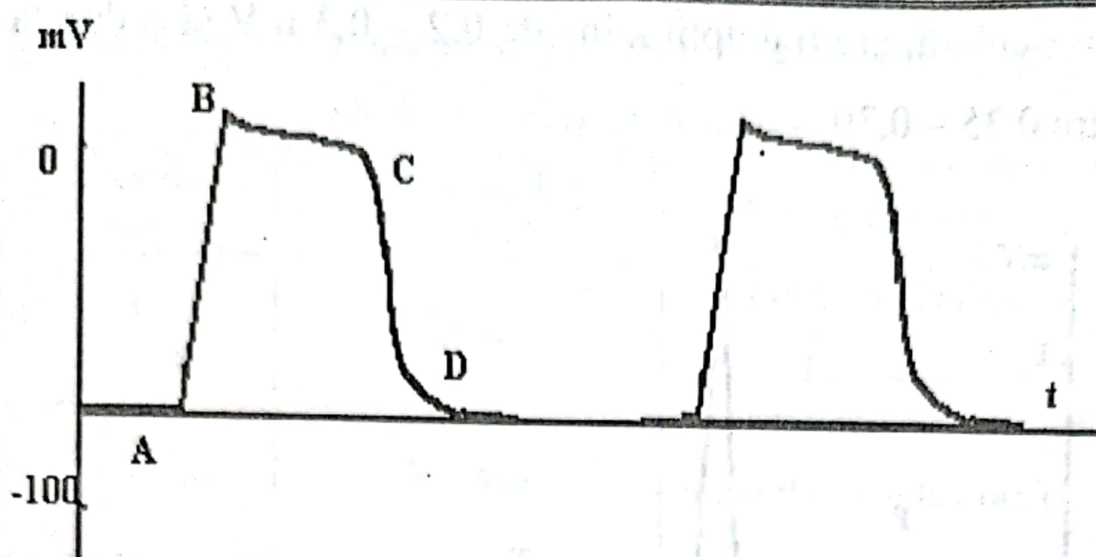


Figura 58. - Variaţia potenţialului de membrană în celula musculară cardiacă (după F. Gremy şi J. Perrin 1975).

- - unda P - reprezintă o depolarizare de mică amplitudine ce precede complexul QRS şi are o semnificaţie similară (activarea miocardului atrial);
- - complexul QRS – de depolarizare ventriculară;
- - unda negativă Q - este o hiperpolarizare iniţială de foarte mică amploare uneori imperceptibilă;
- - unda pozitivă R - de depolarizare rapidă şi amplă care, în unele cazuri poate fi urmată de o a doua depolarizare la fel de rapidă dar mai puţin amplă, notată R′ ;
- unda negativă S- de mică amplitudine, urmată, în unele cazuri de o a doua undă, S′ ;
- - unda T – corespunde fazei de repolarizare ventriculară şi relaxării musculaturii ventriculare şi apare la întreaga masă

ventriculară, are o amplitudine de 0,2 – 0,3 mV şi o durată între 0,35 – 0,30 sec.

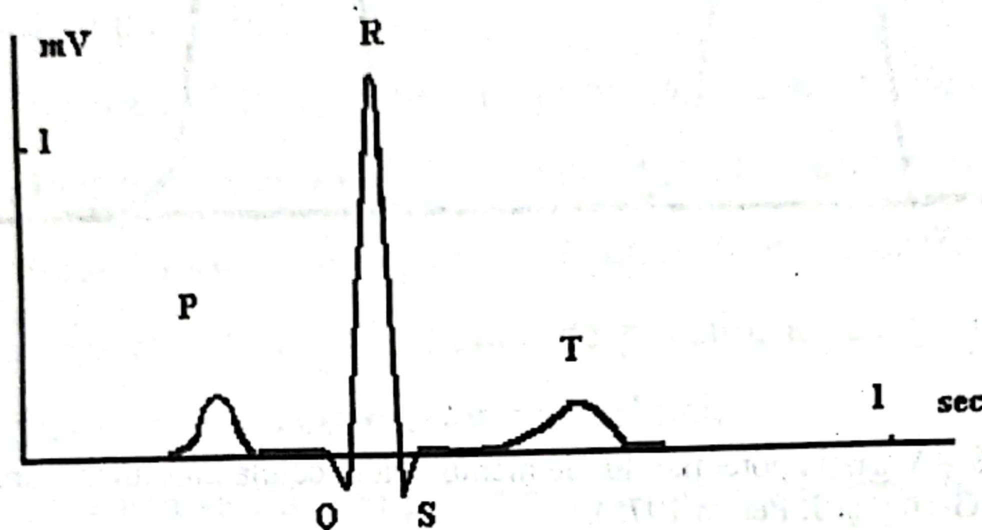


Figura 59. - Variaţia diferenţei de potenţial electric dintre doi electrozi plasaţi pe ţesutul cutanat

Modelul vectorial de activare a componentelor electrocardiogramei dacă se consideră inima ca pe un dipol electric ce variază în timp.

Dintre studiile publicate de noi asupra potenţialelor de acţiune de la nivelul celulei musculaturii striate menţionăm articolele publicate în reviste ca J. Muscle Res. &Cell Motility (M. Isac şi col. 1987) şi Pflügers Arch. (M. Isac şi col. 1988).

Tabelul 9. Componentele semnalului electrocardiografic

(după F. Gremy şi J. Perrin, 1975)

Miocard Auricular	Miocard Ventricular	Electrocardiograma
1 repaus	Repaus	potenţial de repaus (linia de zero)
2 în curs de depolarizare	Repaus	unda P (complex rapid)
3 excitat	Repaus	linia de zero (izoelectrică)
4 în curs de repolarizare	în curs de excitare (depolarizare)	QRS (complex rapid ventricular)
5 repaus	Excitat	linia de zero (izoelectrică)
6 repaus	în curs de repolarizare	unda T

CAPITOLUL 12

Elemente biofizice de interacţiune şi comunicare celulară

12.1. Semnalizarea intercelulară: hormoni şi proteine receptoare

În organismele multicelulare, există o reţea de comunicare intercelulară, complexă, care coordonează creşterea, diferenţierea şi metabolismul diverselor ţesuturi şi organe. Între grupe mici de celule comunicarea se poate realiza prin contact direct între celule (la nivelul joncţiunilor celulare). În cazul în care celulele trebuie să comunice între ele la distanţe mai mari decât pot asigura contactele directe intercelulare, atunci intervin unii produşi extracelulari care acţionează ca semnale intercelulare (Figurile 60, 61, 62).

Astfel, celulele semnalizatoare sintetizează şi eliberează substanţe specifice - molecule semnal - sau mesageri chimici, care se deplasează spre alte celule ţintă, prevăzute cu receptori specifici, în care induc un răspuns specific.

Unele molecule semnal induc modificări în activitatea uneia sau mai multor enzime prezente întotdeauna în celulele

ţintă, răspunsul survenind la un interval variabil de timp (minute sau secunde).

La animale, majoritatea acestor molecule semnal sunt solubile în apă şi se leagă la receptori de pe membrana celulară (Figura 63).

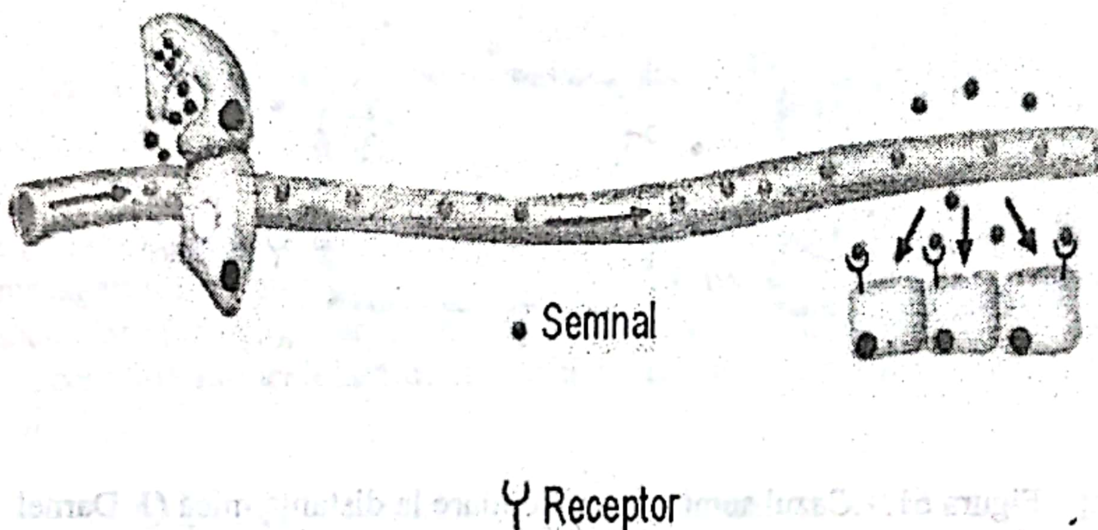


Figura 60.- Secreţia de mesager chimic a unei glande endocrine (stânga) se transmite prin vasele de sânge către celulele ţintă aflate la distanţă (dreapta) (J. Darnell şi col. 1990)

Alte molecule semnal alterează mecanismul exprimări genetice (Figura 64), acestea sunt puţin hidrosolubile, fiind mai ales liposolubile, induc răspunsuri mai târzii în celulele ţintă. Cei mai reprezentativi, sunt hormonii steroizi care se leagă la receptori intracelulari, controlând anumite regiuni ale moleculelor de acid dezoxiribonucleic.

O proteină receptoare de la suprafaţa membranei celulei ţintă sau din citoplasmă sau din nucleul acestei celule, prezintă un situs de legare cu mare afinitate pentru o anume substanţă semnal: hormon sau neurotransmiţător. Moleculele semnal sunt în postura de liganzi.

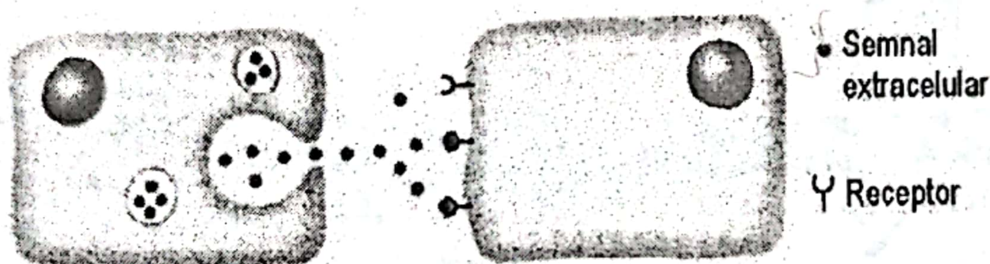


Figura 61. - Cazul semnalizării celulare la distanţă mică (J. Darnel şi col. 1990).

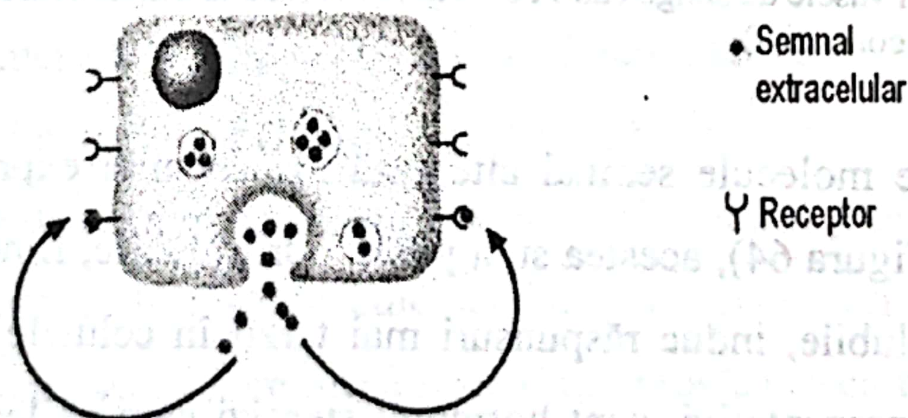


Figura 62. - Semnalizarea celulară poate avea ca ţintă chiar celula care secretă molecula semnal (J. Darnell şi col., 1990)

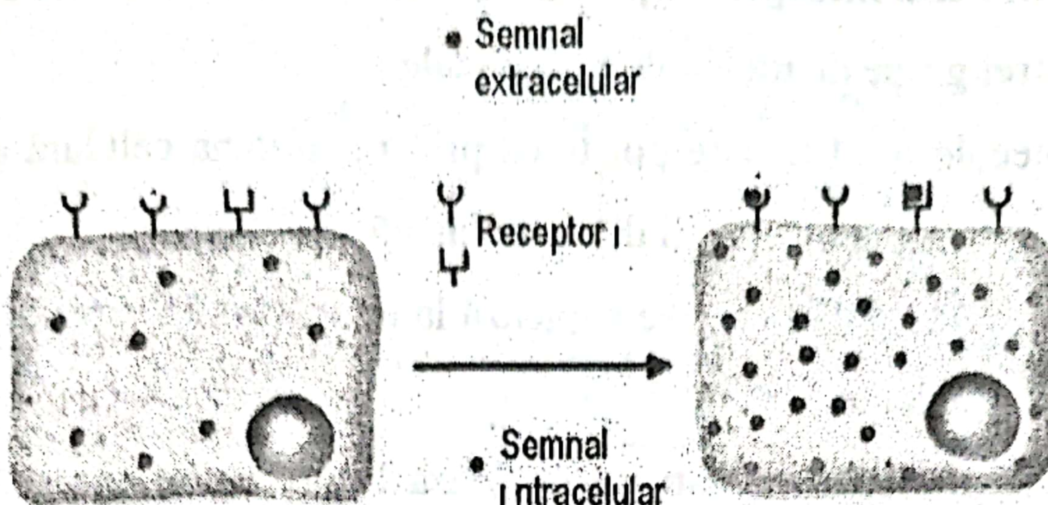


Figura 63. - Receptori aflaţi la suprafaţa membranei celulare. În lipsa mesagerului primar, în citoplasmă există un nivel scăzut de mesageri secundari (stânga), dar după cuplarea mesagerului primar cu receptorul, concentraţia intracelulară de mesager secundar creşte sensibil (J. Darnell şi col. 1990)

Cuplarea ligandului la proteina receptoare se poate realiza prin forţe de interacţiune slabe, *de natură electrostatică (forţe van der Waals), forţe ionice şi legături hidrofobe,* care determină modificări ale momentului dipolar electric al receptorului şi declanşează o serie de reacţii care modifică funcţiile celulei.

Printre moleculele semnal care se cuplează la receptorii de pe suprafaţa membranei celulare se pot exemplifica : hormonii peptidici, prostaglandinele, aminoacizii, epinefrinele şi compuşi înrudiţi, care declanşează creşterea sau scăderea concentraţiei citoplasmatice de mesageri secundari (cAMP, Ca^{2+}, 1,2-diacilglicerol).

In cazul mesagerilor primari din categoria hormonilor se disting trei grupe de molecule funcţionale :

- Molecule lipofile care pot trece prin membrana celulară şi se cuplează la receptorii din citoplasmă sau nucleu;
- Molecule lipofile care se cuplează la receptorii de suprafaţă ai plasmalemei;
- Molecule hidrofile care se cuplează la proteinele receptor de la suprafaţa membranei citoplasmatice (plasmalema);

Din prima grupă, cei mai reprezentativi sunt steroizii, tiroxina şi acidul retinoic. Hormonii steroizi, de exemplu, interacţionează cu receptori citoplasmatici sau nucleari formând complexe moleculare ce se acumulează în nucleu, unde se leagă la secvenţe specifice reglatoare din molecula de acid dezoxiribonucleic crescând sau diminuând viteza de transcripţie a genelor corespunzătoare (Figura 64).

Grupa a doua este reprezentată de prostaglandinele care acţionează modulând răspunsul altor hormoni, implicaţi, spre exemplu în, iniţierea contracţiei musculaturii netede.

În cea de a treia grupă sunt incluse polipeptidele mari ca insulina (Figura 65) şi hormonii de creştere sau compuşi mici, încărcaţi electric cum sunt epinefrinele.

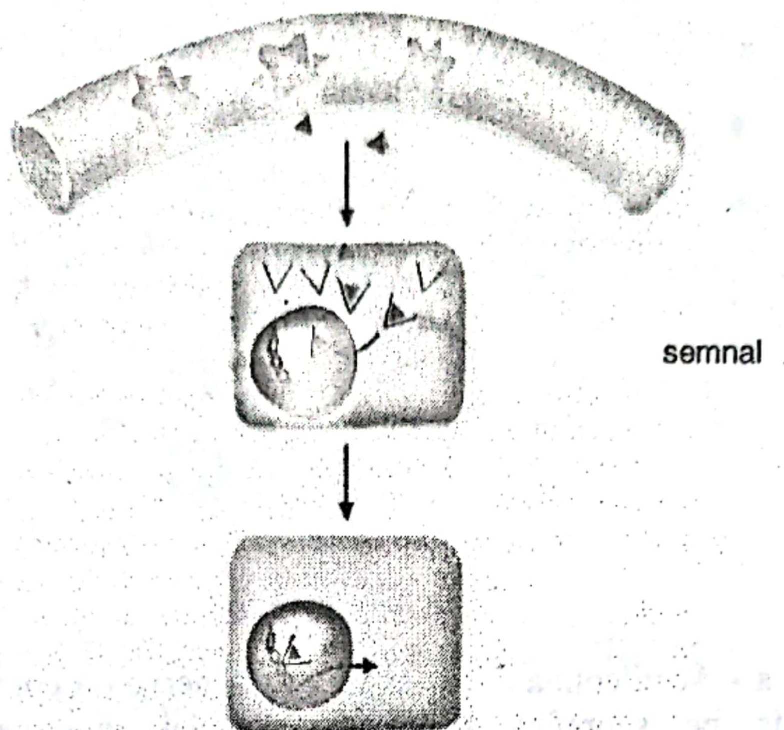


Figura 64. - Cuplarea mesagerilor liposolubili - steroizi, tiroxină, acid retinoic - (triunghiuri) la receptori citosolici sau nucleari determină modificări la nivelul acizilor nucleici (J. Darnell şi col. 1990)

Unii mesageri chimici care se cuplează la proteinele receptoare de pe suprafaţa plasmalemei determină activarea unei enzime (Figurile 66 şi 67) care generează o creştere a concentraţiei intracelulare a unui alt mesager - mesager secundar - implicat la rândul său, în modificarea activităţii altei enzime sau proteine neenzimatice din celulă.

Exemple de mesageri secundari sunt: AMP-ul ciclic (cAMP), GMP-ul ciclic (c-GMP), diacilglicerolul, ionii de calciu, inositolul, ş.a.

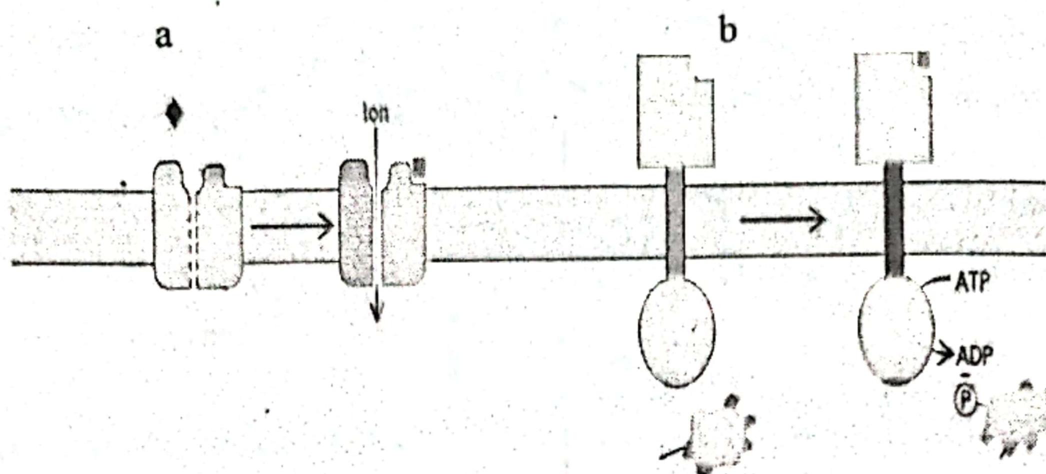


Figura 65. **a** - Acetilcolina eliberată de celula nervoasă controlează canalul cationic de pe suprafaţa membranei celulei musculare (joncţiunea neuromusculară); **b** - Insulina controlează proteinkinaza care controlează fosforilarea unui substrat proteic (J. Darnell şi col. 1990)

Un tip de ligand deosebit de important pentru transportul prin membrană se referă la acele substanţe, molecule sau ioni, capabile să activeze canalele ionice - agregate proteice membranare care permit trecerea fluxurilor de ioni mici prin biomembrane (Figura 65). În acest caz situsul de legare a mesagerului este situat pe una din subunităţile constitutive ale canalului ionic.

Molecule analoage structural hormonilor naturali pot fi recunoscute de receptorii respectivi determinând două situaţii:

- declanşarea răspunsului specific, normal - agonişti;

- cuplarea cu proteinele receptoare fără declanşarea răspunsului aşteptat - antagonişti.

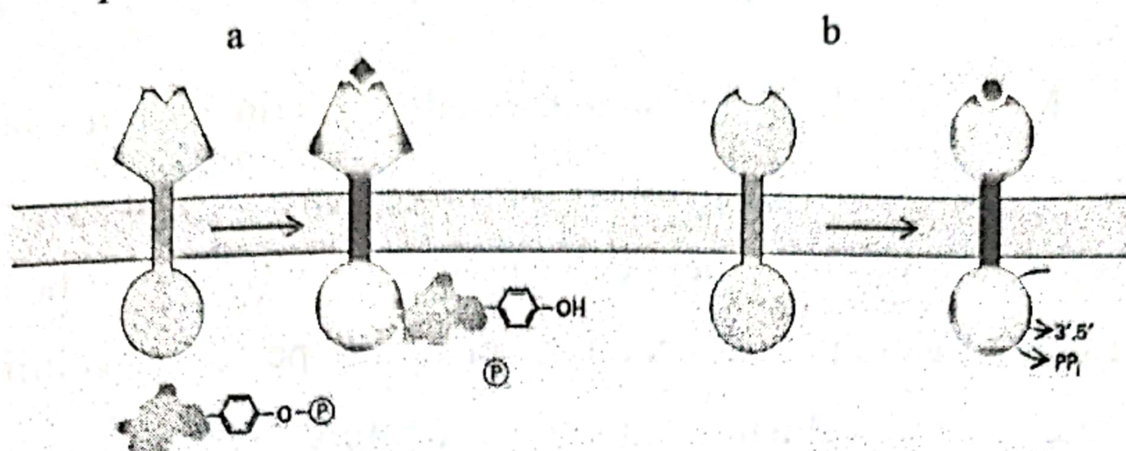


Figura 66. a - Tirozinfosfataza proteică controlată de ligand; b - guanilat ciclază controlată de ligand (J. Darnell şi col.1990)

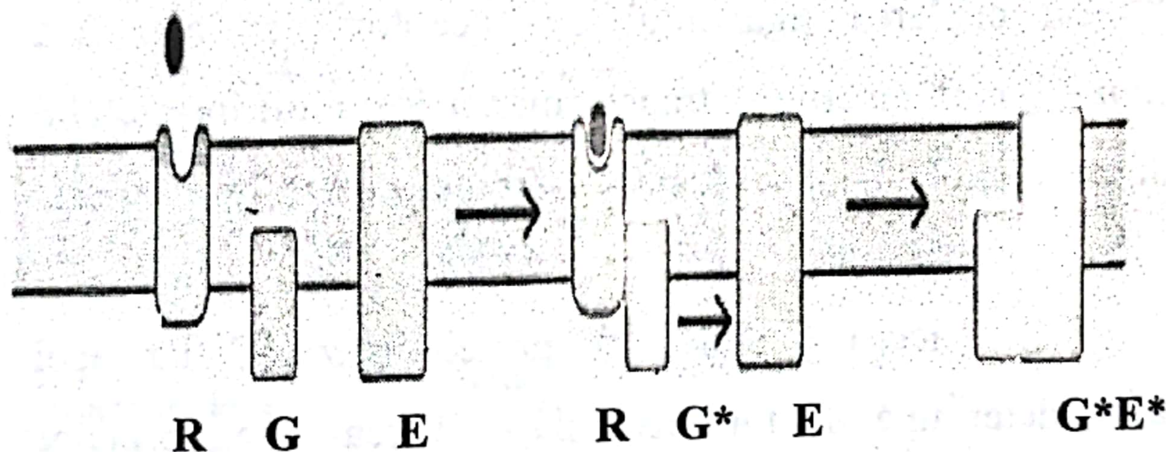


Figura 67. - Activarea controlată de ligand a proteinei G traductoare care activează o enzimă ce declanşează generarea unui mesager secundar (R - receptor, G - proteina G - inactivă, G* - proteina G activată, E - enzima inactivă, E* - enzima activată) (J. Darnell şi col. 1990)

Antagoniştii intră în competiţie cu hormonii naturali sau agoniştii, limitând posibilitatea de acţiune a acestora - blocându-le activitatea fiziologică.

12.1.1. Ionii de calciu - mesageri secundari

Mai mulţi hormoni sunt capabili, ca prin cuplarea la receptorii membranari de la nivelul plasmalemei, să declanşeze o creştere a concentraţiei de calciu din citoplasmă fără contribuţia calciului extracelular, ci doar pe baza golirii depozitelor intracelulare ataşate reticulului endoplasmic. Mecanismul propus şi susţinut de dovezi experimentale este redat în schema de mai jos (Figura 68).

La cuplarea ligandului cu receptorul se activează *proteina G* care determină transformarea fosfatidil inositolului în diacilglicerol şi inositoltrifosfat (transformare în care este implicată şi fosfolipaza C).

Diacilglicerolul activează proteinkinaza C iar apoi aceasta determină fosforilarea şi activarea unor proteine capabile să declanşeze reacţii biochimice în celulă sub forma răspunsului celular specific.

Inositoltrifosfatul (IP_3) determină deschiderea unor canale ionice de calciu din rezervele citoplasmatice ataşate reticulului endoplasmic. Ionii de calciu eliberaţi reprezintă un mesager secundar, creşterea nivelului calciului citoplasmatic

declanşând, de exemplu un alt răspuns celular cum ar fi contracţia musculară (M. Isac şi col. 1987).

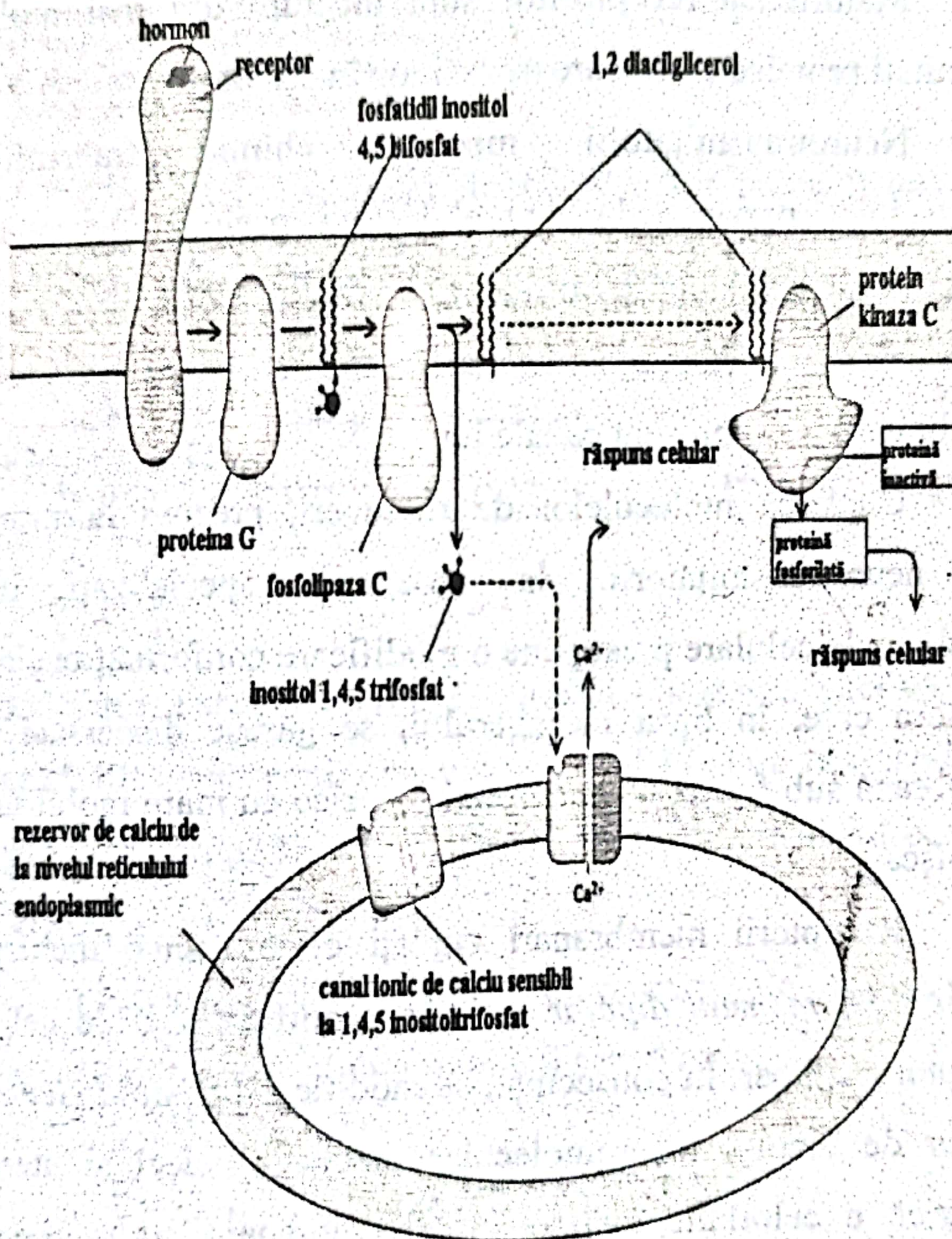


Figura 68. - Rolul calciului de mesager secundar (explicaţia în text) (J. Danell şi col. 1990)

12.1.2. Dinamica receptorilor

Majoritatea receptorilor sunt alcătuiţi din mai multe subunităţi proteice cu o mare mobilitate în membrană.

Neurotransmiţătorii mediază chimic transmisia impulsului nervos la nivelul sinapselor neuronale corespunzătoare (sinapse chimice) cuplându-se la situsurile de legare ale unor canale ionice sau cuplându-se la receptorii membranari, care nu sunt canale ionice.

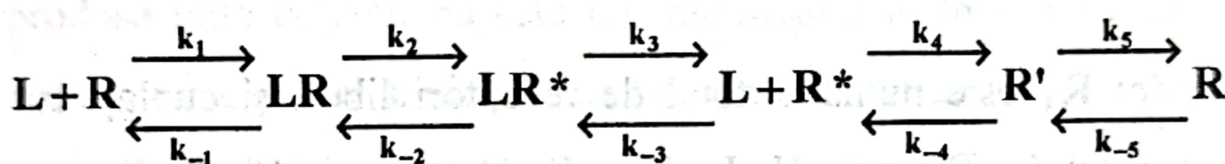
Cuplarea moleculelor de mesageri, precum hormonii sau neurotransmiţătorii, la receptorii specializaţi din membranele celulare presupune o modificare conformaţională a acestora care, în lipsa mesagerului, se găsesc dispersate în membrană sub formă de subunităţi proteice cu mare mobilitate de mişcare.

Receptorii membranari cuplaţi cu molecule mesager prezintă un *moment dipolar electric*, modificat faţă de cel al receptorului liber. În consecinţă, se modifică *şi câmpul electric radiat* de dipolul macromolecular rezultat şi deci şi starea electrică a celorlalte componente membranare cu momente dipolar electrice se modifică. În aceste circumstanţe se produce şi activarea unor enzime (molecule proteice dipolar-electrice)

care preiau mesajul de la receptorii membranari şi declanşează anumite reacţii biochimice în celulă, ajungându-se la finalitatea comunicării intercelulare pe bază de molecule mesager.

12.1.3. Cinetica interacţiunii ligand - receptor

Cinetica interacţiunii ligand receptor poate fi descrisă prin schema următoare:



$$L+R \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} LR \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftarrows}} LR^* \underset{k_{-3}}{\overset{k_3}{\rightleftarrows}} L+R^* \underset{k_{-4}}{\overset{k_4}{\rightleftarrows}} R' \underset{k_{-5}}{\overset{k_5}{\rightleftarrows}} R$$

unde: **L** şi **R** sunt ligandul şi receptorul - în starea inactivă, **LR** şi **LR*** sunt complexele receptor-ligand în stare neactivată şi respectiv activată, **R′** este receptorul în stare inactivă posibil regenerativă.

Constanta de echilibru a reacţiei de formare a complexului ligand-receptor poate fi scrisă ca:

$$k_D = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[L][R]}{[LR]} \tag{105}$$

unde: parantezele pătrate se referă la concentraţiile respective, de ligand, receptor şi complex ligand - receptor. Ea măsoară afinitatea receptorului pentru ligand şi cu ajutorul ei reacţia de cupare a ligandului cu receptorul poate fi adusă la binecunoscuta formă a relaţiei Michaelis - Menten:

$$\frac{[LR]}{R_{tot}} = \frac{1}{1 + k_D / [L]} \tag{106}$$

unde: R_T este numărul total de receptori liberi şi cuplaţi cu ligandul (J. Darnell, H. Lodish, D. Baltimore, 1990). Pentru acelaşi ligand diferite tipuri de celule ţintă pot avea diferite tipuri de proteine receptoare şi, pe de altă parte, un anume tip de celulă poate avea receptori diferiţi pentru acelaşi ligand. Dar acelaşi tip de receptor poate fi prezent în mai multe tipuri de celule, astfel că acelaşi ligand poate induce diferite răspunsuri.

De exemplu, acetilcolina poate fi receptată de proteine receptor din mai multe tipuri de celule (musculare striate şi cardiace şi unele celule pancreatice). Eliberarea acestui neurotransmiţător din celulele neuronale adiacente celulelor musculaturii striate determină contracţia, iar în celulele cardiace încetinesc viteza de contracţie. Dar sunt situaţii când ,

în unele tipuri de celule, acelaşi răspuns celular poate fi indus de diferite complexe receptor-ligand.

Delimitarea între hormoni şi neurotransmiţători este destul de dificil de făcut, de regulă hormonii acţionând la distanţe mai mici decât neurotransmiţătorii, aceştia din urmă fiind, pe de altă parte eliberaţi din celulele nervoase sub formă de vezicule în spaţiul postsinaptic (la nivelul sinapselor) iar nu de glandele endocrine. Ligandul nu este metabolizat de în produse utile celulei, nu este un intermediar în în vreuna din activătățile celulare şi nici nu are proprietăţi enzimatice.

Moleculele proteice receptoare adesea, degradează sau modifică moleculele semnal. În acest fel, modificându-şi sau încheindu-şi răspunsul specific faţă de ligand, după cum şi modificările structurale sau reducerea situsurilor receptoare stau la baza unor importante mecanisme biologice sau patologice,incomplet elucidate, (ex: activitatea spontană de tip pacemacker, electrogeneza din sindromul miastenic sau miotonic, traseele de tip neurogen sau miogen, etc. (F. Topoliceanu şi I. Haulică şi col., 1984; I. Haulică şi col.,1989).

12.2. Interacţiuni antigen - anticorp

Una din funcţiile sângelui este cea legată de participarea sa la reacţiile imunitare ale organismului, funcţie care se exercită în principal prin intermediul unora din tipurile de celule albe ale sângelui şi anume **limfocitele de tip B şi T,** care participă diferenţiat la realizarea, respectiv a imunității umorale şi a celei celulare.

Generarea răspunsului imun se realizează în raport cu diferiți agenți străini, pătrunşi în interiorul organismului, fie prin distrugerea lor de către limfocitele T activate, în cadrul imunității mediate celular, fie prin geneza unor molecule proteice (globuline), denumite anticorpi, în cadrul imunității umorale, prin interacţiuni de tip angigen - anticorp.

Reacţiile antigen-anticorp constituie fenomene esenţiale avand un rol bine precizat de distrugere, neutralizare sau de eliminare (de către anticorpi) a toxinelor sau a agenţilor patogeni (antigenii). Fenomenele fizico - chimice sunt cele care oferă posibilitatea înţelegerii parţiale, a înaltei specificităţi a acestor interacţiuni, problema rămânând deschisă cercetărilor în domeniu.

12.2.1. Antigenii

Dacă *anticorpii* sunt în exclusivitate *molecule proteice*, aşa cum se va arăta mai jos, *antigenii* pot fi *polipeptide, lipopolizaharide, acizi nucleici* ş.a, care în urma pătrunderii în organism pot declanşa un răspuns imun, adică induc elaborarea de anticorpi (fenomenul de imunogenitate) care reacţionează specific ***in vivo*** şi ***in vitro***, sub forma complexului antigen-anticorp.

Structura antigenilor conţine o parte extinsă, cu rol de purtător (un suport coloidal constituit în principal dintr-o proteină cu masă moleculară mare) şi o grupare determinantă (determinant antigenic sau situs antigenic sau ***epitop***), care este un fragment cu masă moleculară mică aparţinând, de asemenea moleculei de antigen.

O moleculă de antigen poate avea unul sau mai multi epitopi, numiţi şi situsuri antigenice sau haptene.

Dacă un antigen are o singură grupare determinantă (haptenă), atunci este denumit antigen monovalent şi poate să reacţioneze cu un singur anticorp. Dacă antigenul are mai multe haptene atunci se numeşte polivalent şi poate să se lege

simultan de mai mulţi anticorpi. Valenţa antigenilor poate ajunge la valoarea de 500.

12.2.2. Anticorpii

Anticorpii sunt proteine din clasa *imunoglobulinelor* cu o greutate moleculară mare, de la 100.000 Da la 1.000.000 Da, elaborate în principal de limfocitele de tip B, unele limfocite de tip T, putând fi implicate în formarea anticorpilor şi reglarea complexă a întregului mecanism imun, inclusiv cel natural.

Imunoglobulinele (Ig) se împart, după masa lor moleculară, după compoziţia chimică şi după constanta de sedimentare, în clase denumite: **Ig G, Ig A, Ig M, Ig D, Ig E,** etc. Ele reprezintă structuri proteice care includ un situs de combinare (analog situsului antigenic) numit şi ***paratop*** la nivelul căruia, se realizează legătura cu antigenul. Aceasta are loc la nivelul jumătăţii terminale a legăturii azotice compusă din lanţurile H şi L, jumătatea terminală C formată din lanţuri grele individuale determinând clasa anticorpilor.

Schema unei imunoglobuline prezintă **"lanţuri grele"** de atomi şi **"lanţuri uşoare"**, legate prin punţi disulfurice (Figura 69). Structurile primare şi secundare sunt cunoscute pentru mai multe imunoglobuline.

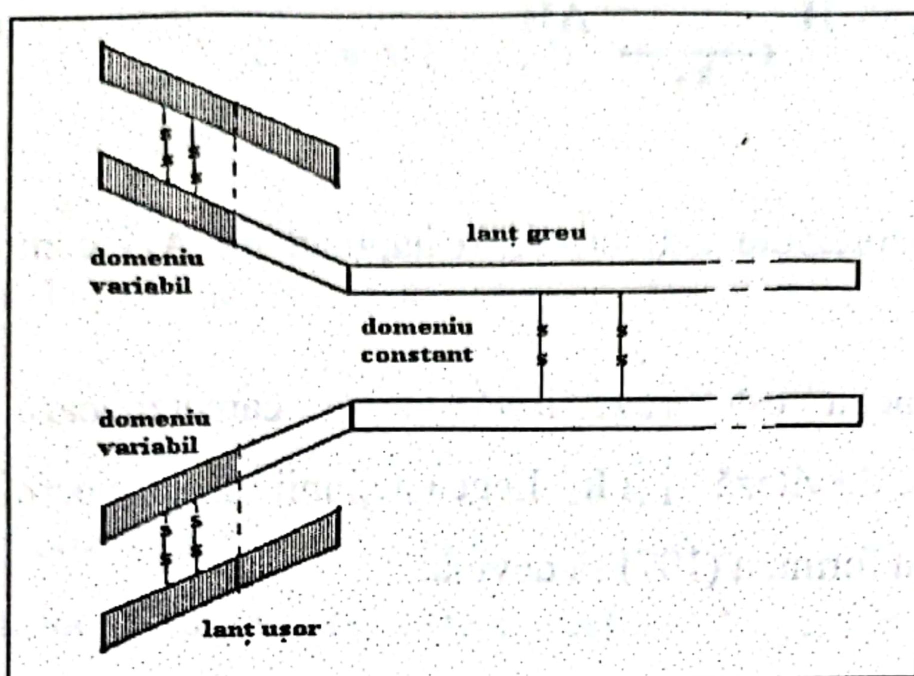


Figura 69. - Reprezentare schematică a unui anticorp bivalent. Lanţurile paralele din structura primară sunt unite prin legături disulfurice (modificat după F. Gremy şi J. Perrin 1975).

La categoriile **IgG** şi **IgA** întâlnim asociaţii de două "lanţuri grele" şi "lanţuri uşoare"; imunoglobulinele **Ig M** sunt compuse din ansambluri de "lanţuri grele" şi "lanţuri uşoare" în număr egal dar numărul lanţurilor este un multiplu al celui care se găseşte în alte imunoglobuline.

Cel mai adesea imunoglobulinele sunt bivalente, dar pot fi şi multivalente. În cazul cel mai simplu, interacţiunea elementară între o haptenă şi un anticorp univalent se scrie:



$$A + H \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} AH \qquad (107)$$

unde: **A** reprezinta anticorpul, **H**-haptena iar **AH** complexul format.

Reacţia este reversibilă şi se caracterizează prin constantele de viteză $\mathbf{k_1}$ şi $\mathbf{k_2}$. Legea acţiunii maselor permite ca la echilibru formula (107) să devină:

$$\frac{[AH]}{[A][H]} = \frac{k_1}{k_2} = K \qquad (108)$$

unde: **K** este constanta de echilibru, $[A]$, $[H]$ şi $[AH]$ sunt respectiv concentraţiile de anticorp liber, haptenă liberă şi imunocomplex (complexul antigen-anticorp).

Cunoscând valoarea lui **K** este uşor de calculat variaţia energiei libere de reacţie:

$$\Delta G = - RT \ln K \qquad (109)$$

unde: **G** - este energia libera a reactiei, **R** - constanta universală a gazelor perfecte iar **T** - temperatura absolută. Energia de legătură antigen - anticorp rezultă din ecuaţia lui Gibbs:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \qquad (110)$$

în care: **S** este entropia iar **H** este entalpia liberă (energia de legătură la presiune normală).

Studiile efectuate arată că variaţia entropiei este uimitor de mică dar aceasta se explică prin faptul că se poate măsura numai variaţia de entropie globală pentru două tipuri de procese care au loc (unul este cel care interesează în primul rând din punct de vedere imunologic şi presupune diminuarea numărului de grade de libertate ale moleculelor legate dar există şi un al doilea proces şi anume procesul de îndepărtare a moleculelor de apă legate (adsorbite) care precede fixarea antigenului pe anticorp.

$$\Delta S = \Delta S_1 - \Delta S_2 \qquad (111)$$

$$\Delta S_1 > 0, \Delta S_2 < 0; |\Delta S_1| \cong |\Delta S_2| \qquad (112)$$

Dacă ordinul de mărime a lui **ΔG** este de cca.7 kcal/mol atunci şi pentru energia de legătură se obţin valori la fel de mici şi cu puţine diferenţe de la o reacţie la alta.

12.2.3. Natura forţelor implicate în interacţiunile elementare antigen - anticorp

Interacţiunile antigen - anticorp se derulează în două faze succesive, o fază primară (elemenatră) şi o fază secundară.

Energia mică de legătură a reacţiilor elementare şi influenţa pH-ului asupra cineticii reacţiilor (pH-ul optim este 7,3 - 7,5 similar cu valoarea serului sangvin), arată că forţele de legătură nu sunt covalente (la acestea energia de legătură fiind de 50÷100 kcal/mol), ci de natură electrostatică, ceea ce nu este de mirare ştiind că sunt implicate proteine amfolite; avem de-a face aşadar cu :

- legături ionice;
- forţe electrostatice de atracţie între grupuri cu sarcini electrice de semne opuse;
- forţe electrice de interacţiune dipol - dipol;
- forţe de dispersie Van der Waals - London între grupări de atomi iniţial neâncărcate electric dar care se pot polariza;
- interacţiuni între grupe de atomi hidrofobe.

Structura anticorpilor şi antigenilor permite o reprezentare care sugerează şi faptul că, deşi slabe, legăturile electrostatice se manifestă în contextul stereospecificităţii

imunocomplexului ceea ce duce la deosebita stabilitate a acestuia.

12.2.4. Reacţiile secundare

Este destul de probabil că dacă reacţia antigen - anticorp s-ar limita la reacţia elementară descrisă mai sus, atunci nu s-ar cunoaşte încă decât puţine lucruri în imunologie şi chiar finalitatea acestui tip de reacţie ar fi mai puţin clară căci imunocomplecşii sunt adesea solubili şi greu de evidenţiat microscopic (se apelează la metode radioimunochimice – RIA).

Dar cum, în majoritatea cazurilor reacţia elementară este urmată rapid de reacţii secundare, ce duc la transformări mult mai uşor de pus în evidenţă, cercetările care s-au întreprins, au avut puncte de sprijin importante în aceste reacţii secundare.

În majoritatea cazurilor fenomenul secundar este atât de dominant încât serveşte la definirea reacţiei considerate. Reacţiile secundare sunt mult mai uşor de pus în evidenţă căci se însoţesc de precipitări, floculări, aglutinări, hemolize, etc. şi acestea sunt uşor de observat macroscopic.

Nu trebuie scăpat din vedere, că numai reacţia elementară este specifică (reacţiile secundare nu sunt specifice) adică reacţii primare diferite pot antrena aceeaşi reacţie secundară .

12.2.5. Cinetica formării imunocomplexului antigen-anticorp

În cazul cel mai simplu, al unui anticorp monovalent şi al unei haptene libere (singurul caz real cunoscut este cel al brucelozei) ecuaţia diferenţială care a fost propusă să descrie cinetica procesului (cinetică de ordinul doi):



$$\mathbf{A+H=AH} \quad (113)$$

corespunde, de fapt, cineticii concentraţiei de anticorp:

$$\frac{\mathbf{da(t)}}{\mathbf{dt}} = -\mathbf{k_1 a(t) h(t)} \quad (114)$$

unde: **a(t)** şi **h(t)** sunt concentraţiile de anticorp şi respectiv de antigen la momentul de timp **t** iar $\mathbf{k_1}$ este constanta de cuplare a celor doi reactanţi.

La momentul iniţial $\mathbf{t_0=0}$ aceste concentraţii au valorile $\mathbf{a_0}$ şi $\mathbf{h_0}$ iar consumul este 1:1 (o moleculă de anticorp la o moleculă de antigen) permite scrierea relaţiei de legătură:

$$a_0 - a(t) = h_0 - h(t) \qquad (115)$$

cu ajutorul căreia se poate ajunge la o ecuaţie cu o singură variabilă - **a(t)**. Astfel ecuaţia de mai sus devine:

$$\frac{da(t)}{dt} = -k_1\left[a^2(t) + (h_0 - a_0)a(t)\right] \qquad (116)$$

Se separă variabilele pentru a integra:

$$\int \frac{da(t)}{a^2(t) + (h_0 - a_0)a(t)} = \int -k_1 dt \qquad (117)$$

Folosind condiţiile iniţiale şi în ipoteza unui exces de antigeni (caz apropiat de situaţiile reale), se obţine:

$$\ln \frac{a(t)h_0}{a_0\left[a_0(a(t) + h_0 - a_0)\right]} = -k_1 t(h_0 - a_0) \qquad (118)$$

ceea ce reflectă o variaţie exponenţială în timp a concentraţiei de anticorp.

În forma logaritmică, relaţia dedusă mai sus este foarte convenabilă pentru determinarea experimentală a raportului

concentraţiilor de la momentul iniţial precum şi a constantei de viteză a procesului (dacă se cunoaşte cel puţin una din aceste concentraţii iniţiale).

Practic se lucrează prin marcare cu izotopi radioactivi în cazul evaluărilor radioimunologice (RIA – radioimmunologycal assay), datele numerice prelucrându-se prin atât de cunoscuta metodă a celor mai mici pătrate (pentru obţinerea numerică a pantei şi tăieturii la ordonată a dreptei celei mai probabile).

Dacă iniţial cele două concentraţii de reactanţi sunt egale atunci ecuaţia diferenţială devine:

$$\frac{da(t)}{dt} = -k_1 a^2(t) \tag{119}$$

iar integrarea conduce la:

$$\frac{1}{a(t)} = \frac{1}{a_0} + k_1 t \tag{120}$$

ceea ce conduce la evaluări şi mai rapide ale concentraţiilor iniţiale şi ale constantei vitezei de formare a

imunocomplexului, având în vedere că graficul este o dreaptă (Figura 70).

Reversibilitatea procesului este mult mai puţin probabilă, constanta de viteză a desfacerii imunocomplexului fiind cu multe ordine de viteză mai mică decât cea a formării complexului antigen-anticorp.

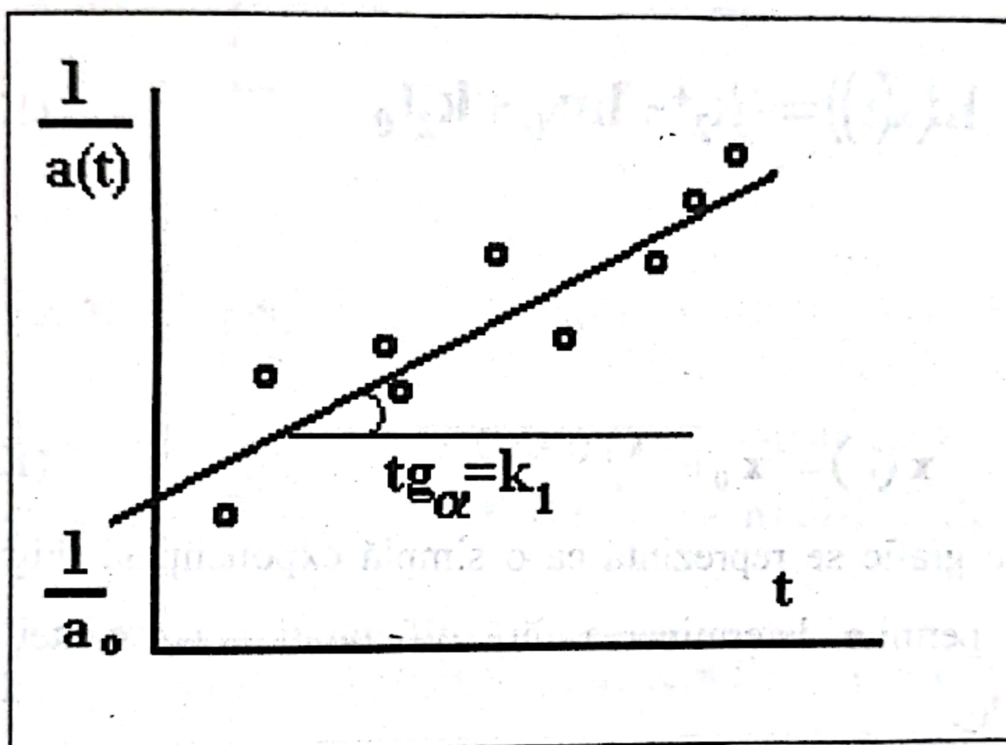


Figura 70. - Dependenţa liniară de timp a inversului concentraţiei de anticorp în cazul când concentraţiile iniţiale de reactanţi sunt egale

12.2.6. Cinetica desfacerii complexului imunologic

Ecuaţia diferenţială propusă pentru descrierea acestei faze a procesului corespunde unei cinetici de ordinul întâi:

$$\frac{dx(t)}{dt} = -k_2 x(t) \qquad (121)$$

unde: **x(t)** este concentrația de imunocomplex la momentul de timp **t** iar x_0 este valoarea acestei concentrații la momentul inițial considerat, $t_0 \neq 0$.

Prin integrare rezultă:

$$\ln(x(t)) = -k_2 t + \ln x_0 + k_2 t_0 \qquad (122)$$

sau:

$$x(t) = x_0 e^{-k_2(t-t_0)} \qquad (123)$$

ceea ce grafic se reprezintă ca o simplă exponențială (Figura 71) și permite determinarea fără dificultăți a constantei de viteză k_2.

Cunoscând cele două constante de viteză rezultă imediat constanta de echilibru a acestei interacțiuni:

$$k = \frac{k_1}{k_2} \qquad (124)$$

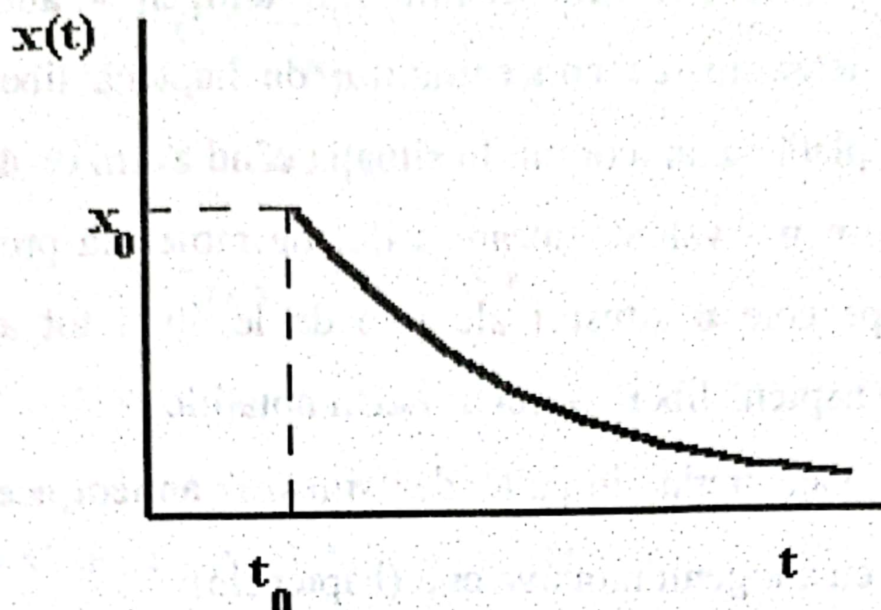


Figura 71.- Scăderea în timp a concentraţiei de complex antigen - anticorp

Pentru evidenţierea interacţiunii antigen-anticorp se poate utiliza fenomenul de difuzie prin membrană dializantă.

12.2.7. Determinarea constantei de echilibru a procesului imunologic pe baza difuziei prin membrana dializantă

Prin cuplarea haptenelor la moleculele proteice de anticorpi, dimensiunile acestora cresc în raport cu cele ale porilor unei membrane dializante, astfel că această membrană permite realizarea echilibrului de difuzie liberă pentru moleculele mici de haptenă, dar nu şi pentru imuncomplecşi.



Informaţiile necesare echilibrului antigen - anticorp rezultă din determinarea concentraţiilor de haptenă liberă şi respectiv, cuplată cu anticorpul. În situaţia când avem de-a face cu un anticorp **n** - valent, fiecare astfel de moleculă proteică poate fixa pe cele **n** situsuri ale sale de legătură tot atâtea molecule de haptenă liberă. Deci utilizăm notaţiile:

- na_0 - concentraţia iniţială de situsuri anticorpice de interacţiune cu antigenii monovalenţi (haptenele);
- a_0 - concentraţia iniţială de anticorpi;
- $x_n(t)$ - concentraţia de complex antigen-anticorp la momentul de timp **t**.

Constanta interacţiunii antigen - anticorp va fi dată (conform definiţiei generale a unei constante de echilibru a unei reacţii) de:

$$k = \frac{x_n(t)}{h(t)[na_0 - x_n(t)]} \qquad (125)$$

Pentru a se pune în evidenţă faptul că se urmăreşte concentraţia de haptenă liberă, aceasta se re-notează cu **c = h(t)**, iar raportul dintre concentraţia de imunocomplex şi concentraţia iniţială de anticorp se notează cu **r:**

$$r = \frac{x_n(t)}{a_0} \qquad (126)$$

Astfel se obţine:

$$\frac{r}{c(t)} = k(n - r) \qquad (127)$$

această relaţie având o formă convenabilă pentru determinările experimentale în care, prin diverse metode fizico-chimice se determină **r** şi **c(t).** Graficul **r/c(r)** este, teoretic, o dreaptă (Figura 69), astfel că pentru **r/c=0** avem **n=r.**

În practică se obţine o curbă, variaţia pantei, **k**, fiind cauzată de faptul că vitezele de reacţie nu sunt mereu constante iniţial, când anticorpii sunt liberi viteza de legare a haptenelor este mai mare decât, atunci când formarea imunocomplexelor îngreunează contactul haptenelor libere cu ceilalţi anticorpi, liberi, deci vitezele de reacţie sunt mai mici.

Altfel spus, funcţia de distribuţie a valorilor unei *„constante de asociere”'* antigen-anticorp, care s-ar putea defini în acest context încetează a mai avea o formă gaussiană, corespunzătoare cazului teoretic.

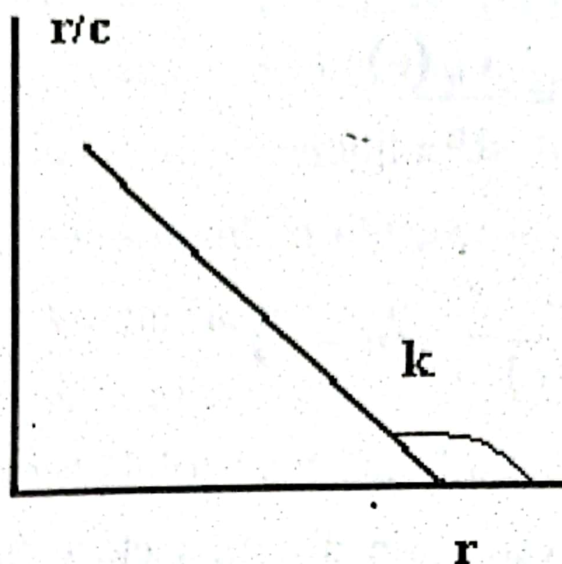


Figura 72. - Dependenţa lui *r/c* de *r* (*r* - raportul dintre concentraţia de imunocomplex şi concentraţia iniţială de anticorp şi *c* - concentraţia de antigen)

Dacă anticorpii liberi sau haptenele sunt fixaţi pe un suport (o membrană semipermeabilă, un adsorbant, particule solide, etc.) atunci reacţia se produce numai dacă există situsuri de reacţie neocupate de legătura la suport. Chiar dacă în astfel de cazuri cinetica este mai heterogenă, starea de echilibru se poate descrie prin aceleaşi legi.

S-a prezentat aici îndeosebi, aspectele fizico-chimice şi matematice fundamentale ale proceselor imunologice căci le considerăm importante pentru înţelegerea mai profundă a aspectelor medicale, atât de complexe, ale interacţiunii antigen-anticorp.

De-a lungul ultimelor decenii au fost efectuate numeroase studii experimentale referitoare la aspectele

biofizice ale imunogenezei, la premisele teoretice ale fenomenelor legate de imunogeneză, la factorii care influenţează producerea anticorpilor şi prezenţa fenomenelor de chinotactism leucocitar din cadrul imunităţii naturale.

Cercetările de biofizică, fiziologie, microcirculaţie şi reologie din laboratoarele universitare ieşene, s-au înscris pe aceată linie cu modestele posibilităţi de care dispun, evidenţiind experimental câteva aspecte legate de efectele toxice ale unor antigeni de tipul pesticidelor (S. Apostol, M. Isac, R. M. Isac, 1987), influenţa câmpurilor magnetice asupra imunogenezei (O. Ailiesei şi M. Isac, 1978) şi particularităţiile hemoreolologice, de chimotactism sau intereacţiunilor citoparietale ale leucocitelor în reţeaua microvasculară (F. Topoliceanu 1991; I. Haulică şi col. 1995).

CAPITOLUL 13

Elemente de biofizică eritrocitară şi hemoreologie

Membrana celulei eritrocitare este una din membranele cele mai mult studiate (alături de membrana celulei nervoase), totuşi detaliile de structură sunt departe de a fi pe deplin clarificate. Datele experimentale existente au permis elaborarea unui model structural şi a unor modele fizice care să explice principalele caracteristici biofizice şi funcţii ale acestei membrane, foarte importantă în contextul funcţiilor complexe îndeplinite de sânge (Figura 81).

13.1. Modelul structural şi modelul fizic al membranei eritrocitare

Ca model structural, membrana eritrocitară se încadrează în *mozaicul fluid*, particularizat pe baza existenţei unor proteine membranare speciale. Astfel, pe lângă proteinele obişnuite extrinseci şi intrinseci, prezente la majoritatea tipurilor de membrane citoplasmatice, dublul strat lipidic este

străbătut de o proteină deosebită, *glicoforina*, de tip intrinsec, cu o pondere de 10% din totalul proteinelor membranare şi 20% din totalul celor intrinseci ale acestei membrane.

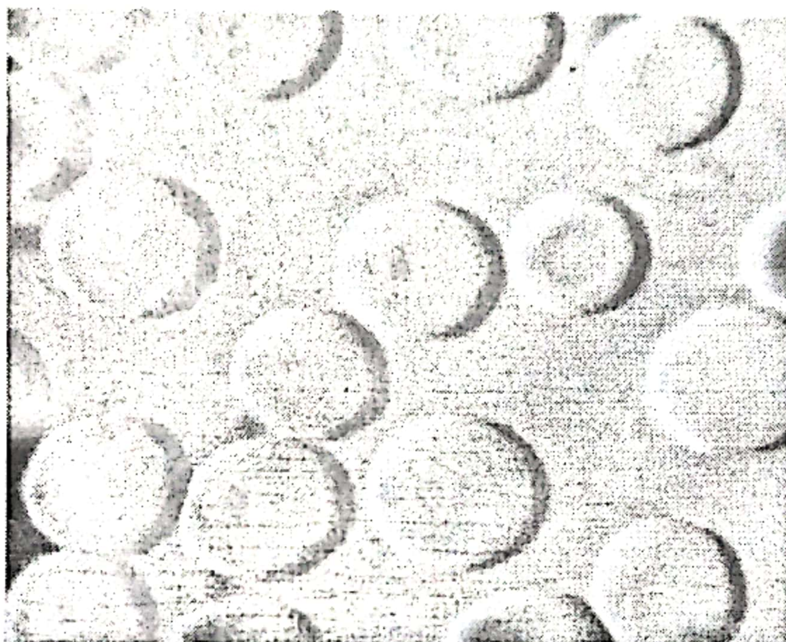


Figura 73. - Eritrocitele au formă de disc subţiat la mijloc (ca o lentilă biconcavă – J. Darnell şi col 1990)

Partea din interiorul membranei este hidrofobă, la fel ca şi lanţurile de acizi graşi din constituţia bistratului lipidic, în timp ce capetele proteinei, aflate la faţa internă şi la cea externă, sunt hidrofile.

Capătul de la faţa externă, care face parte din învelişul celular (structură laxă, pufoasă, cu consistenţă foarte mică în raport cu peretele celular de la microorganisme sau de la celulele vegetale), prezintă mai multe grupări oligozaharidice

(şi mai ales resturi de acid sialic orientate paralel cu planul membranei) a căror presupusă funcţie este cea de menţinere a încărcării electrice negative pentru împiedecarea aglutinării eritrocitelor.

Capătul de la faţa internă se cuplează cu *spectrina*, o proteină submembranară din constituţia eritrocitului, a cărei funcţie pare să fie în principal cea de menţinere a formei de disc biconcav (formă ce asigură o suprafaţă optimă de difuzie a oxigenului transportat de hemoglobina din citoplasma eritrocitului). Practic această proteină, ca şi actina cu structură microfilamentară fac parte dintr-o structură de reţea în care sunt angrenate şi moleculele macroergice de ATP şi au rol însemnat şi în deformabilitatea mecanică a eritrocitului.

Proteina PB3 este numită astfel după poziţia în care a apărut la separarea electroforetică (proteina benzii 3, Figura 74 şi 83). Ea reprezintă circa 55% din totalul proteinelor intrinseci ale membranei şi 25% din totalul proteinelor din constituţia membranei. Aceasta străbate membrana de mai multe ori şi este implicată în transportul anionilor şi, se pare, şi al apei.

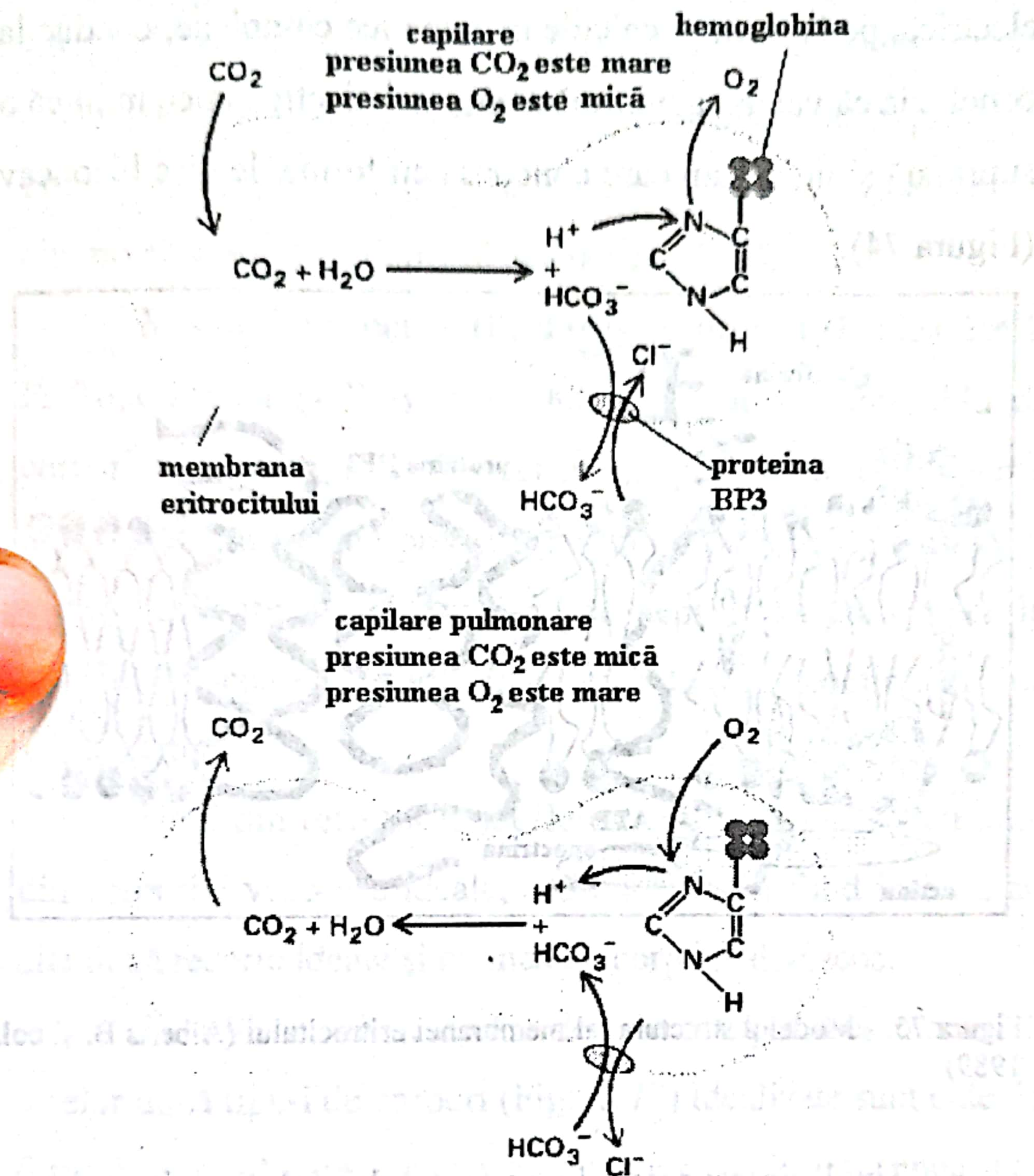


Figura 74. - Proteina BP3 este implicată în transportul prin membrană al anionilor (J. Darnell şi col. 1990)

În ceea ce priveşte forma de disc biconcav a celulei eritrocitare şi încărcarea electrică a acesteia, s-au propus *modele electrostatice* care, pornind de la expresia câmpului

electric în interiorul unei membrane cu dublă încărcare electrică, pe baza unor calcule matematice complexe, conduc la concluzia că valoarea minimă a energiei electrostatice implică o suprafață și un volum care concordă cu forma de disc biconcav (Figura 74).

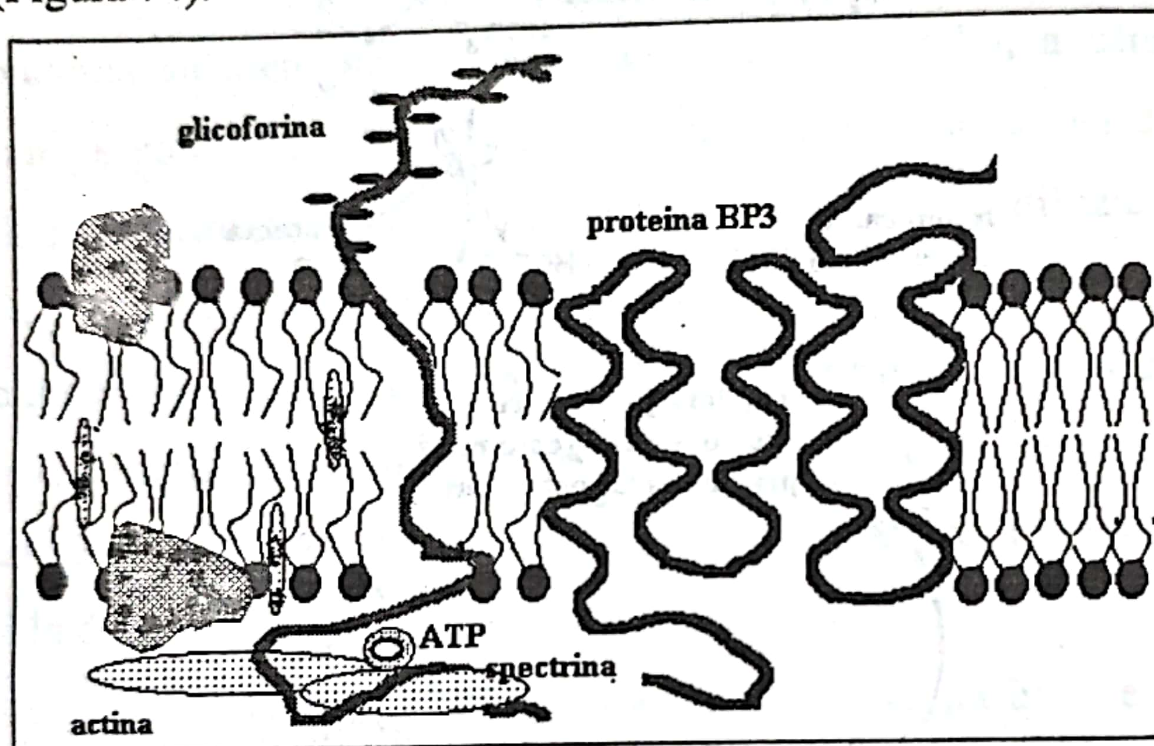


Figura 75. - Modelul structural al membranei eritrocitului (Alberts B. şi col. 1989)

Unul din aspectele importante ale endotilului ca şi cele referitoare la proprietăţile membranei eritrocitului este deformabilitatea sa, evidenţiată mai ales la trecerea acestor celule prin vase sangvine de diametre foarte mici - vasele capilare, cu diametre de 5-10 microni (Figurile 75 şi 76).

Comportamentul reologic complex al sângelui global cât şi al eritrocitului şi cele de chemotaxis al leucocitului a condus la elaborarea unor modele mecanice ce exprimă în primul rând proprietăţile de elasticitate şi vâscozitate ale citomembranelor (Leliebre şi Bucheriri, 1998).

Modelul eritrocitar (F. Topoliceanu şi I.Haulică 1991; F. Topoliceanu şi Polydoru 2000), include un ansamblu de corpuri elastice, reprezentate schematic prin resoarte cu diverse module de elasticitate precum şi prin corpuri de tip amortizor corespunzătoare unor discuri ce se deplasează cu frecare în lichide vâscoase, newtoniene cu diferiţi coeficienţi de vâscozitate.

Unul din resorturile ideale este legat în paralel cu unul din corpurile vâscoase ideale, acest subsistem fiind înseriat cu alte două resorte ideale şi cu încă un corp ideal vâscos.

Relaţiile cantitative care descriu comportarea mecanică a celor două tipuri de corpuri (Figura 77) idealizate sunt date de formulele următoare; pentru corpul elastic ideal recunoaştem legea lui Hooke, de proporţionalitate directă între efortul unitar şi deformaţia relativă iar pentru corpul perfect vâscos avem relaţia de proporţionalitate între efortul unitar şi viteza de variaţie a deformaţiei relative:

$$\sigma = E\varepsilon \quad (128)$$

$$\sigma = \eta\varepsilon' \quad (129)$$

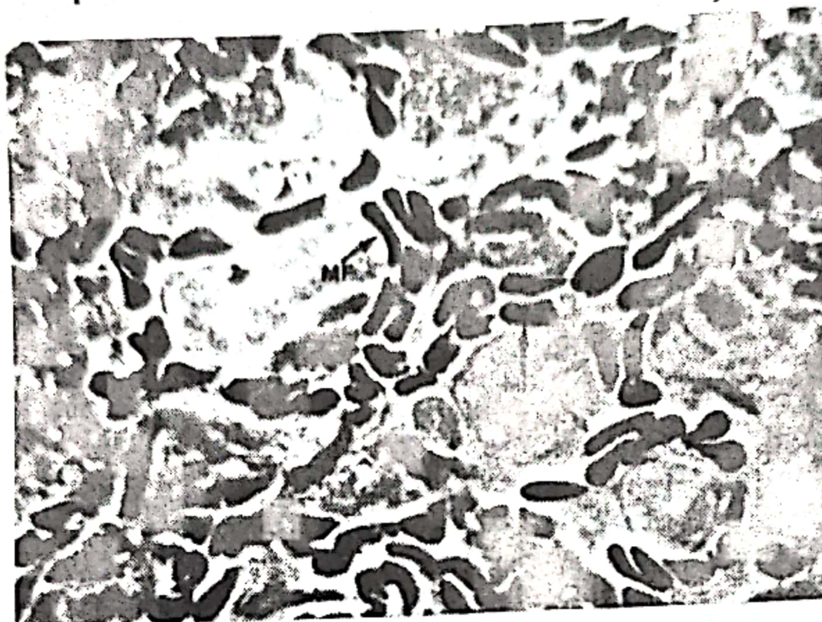


Figura 76. - Diferite distorsionări ale formei eritrocitului la trecerea prin capilarele ce înconjoară alveolele pulmonare (săgeţile indică locurile unde câteva eritrocite sunt adiacente) (după Miyamoto şi Moll citaţi de W. Hope 1983)

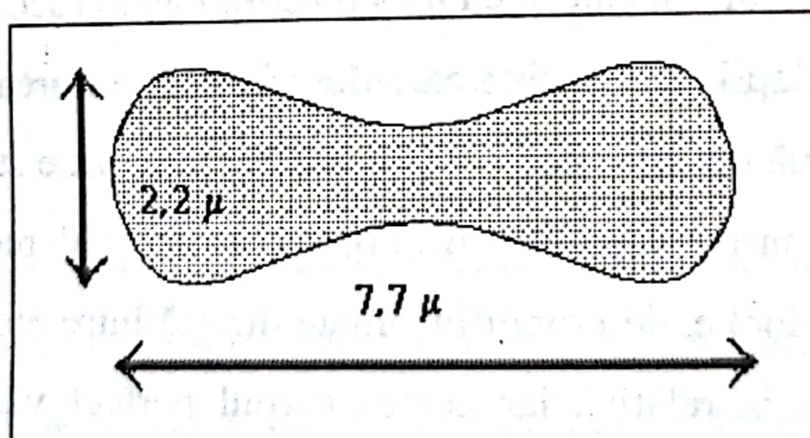


Figura 77. - Dimensiunile micronice definitorii ale profilului de disc biconcav al eritrocitului.

unde: **σ** este efortul unitar (**F** este forţa şi **S** este secţiunea transversală) iar **ε** este deformaţia relativă (**Δl** este deformaţia absolută, l_0 este lungimea iniţială)

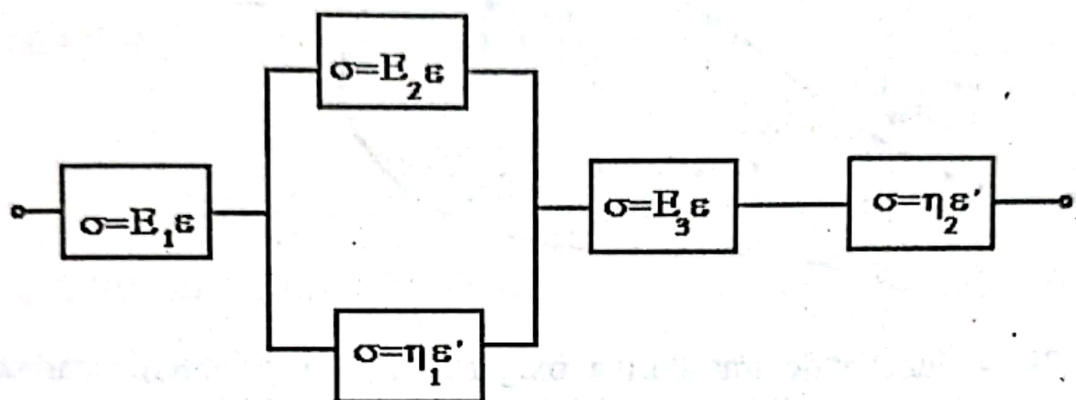


Figura 78. - Modelul mecanic propus pentru descrierea comportamentului reologic al membranei eritrocitare

$$\sigma = \frac{F}{S} \qquad (130)$$

$$\varepsilon = \frac{\Delta l}{l_0} \qquad (131)$$

$$\varepsilon' = \frac{d\varepsilon}{dt} \qquad (132)$$

Eritrocitul este puternic implicat în funcţiile de transport ale oxigenului şi dioxidului de carbon (între plămâni şi celelalte ţesuturi - Figura 79), prin intermediul hemoglobinei.

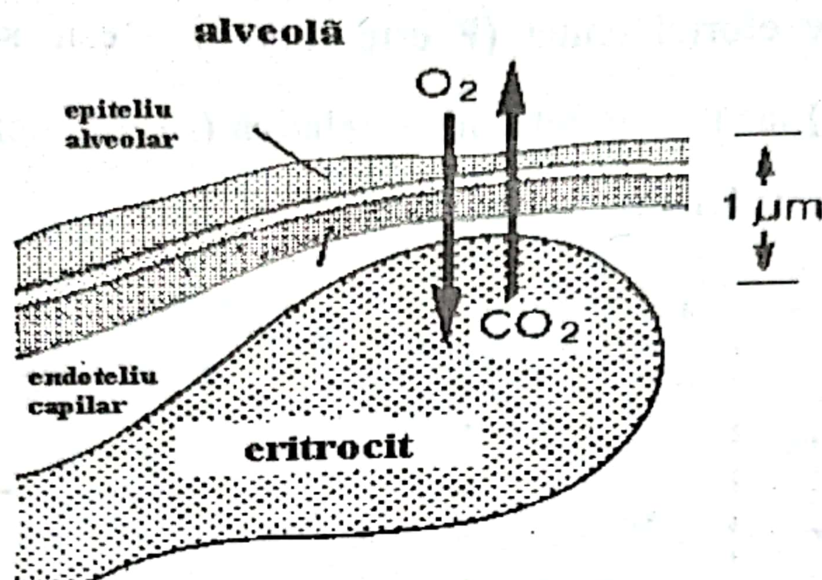


Figura 79. - Funcţia de transport a oxigenului şi bioxidului de carbon realizată de eritrocit (modificat după W. Hope şi colab. 1983)

În mod normal membrana eritrocitului este permeabilă pentru aceste molecule şi este normal să existe unele interacţiuni între componentele membranare şi moleculele de hemoglobină (având în vedere şi formele de oxi-hemoglobină, carboxihemoglobină, etc.).

Într-adevăr s-au evidenţiat *legături electrostatice slabe şi reversibile* între hemoglobină, proteine şi lipide din membrana eritrocitului.

Glicoforina este susceptibilă de astfel de legături cu hemoglobina la nivelul capătului său intracelular ceea ce poate fi pus în corelaţie şi cu influenţa pe care o are hemoglobina în disocierea complexului molecular spectrină-actină. Proteina

PB3 manifestă afinitate pentru oxihemoglobină şi, mai slab, şi pentru deoxihemoglobină.

13.2. Proprietăţi plasto-vâsco-elastice şi reologice ale sângelui

Eritrocitele au o pondere majoră în compoziţia sângelui reprezentând circa 45% din volumul total sangvin, determinând, astfel în mare măsură şi proprietăţile reologice ale acestuia. Într-un model mecanic idealizat, sângele se comportă ca un *corp plasto-vâsco-elastic, nenewtonian, tixotrop* (coeficientul de vâscozitate poate să varieze în timp). Astfel, relaţia dintre efortul unitar şi viteza de deformaţie nu mai corespunde unei drepte ce trece prin origine ci este dată de:

$$\sigma = \sigma_C + U\frac{d\varepsilon}{dt} \qquad (133)$$

în care: σ_C este o valoare critică a efortului unitar, sub care viteza de deformare rămâne constantă - egală cu o valoare prag, iar U este un coeficient de plasticitate, care dă panta dreptei (Figura 80):

$$\mathrm{ctg}\,\alpha = U \qquad (134)$$

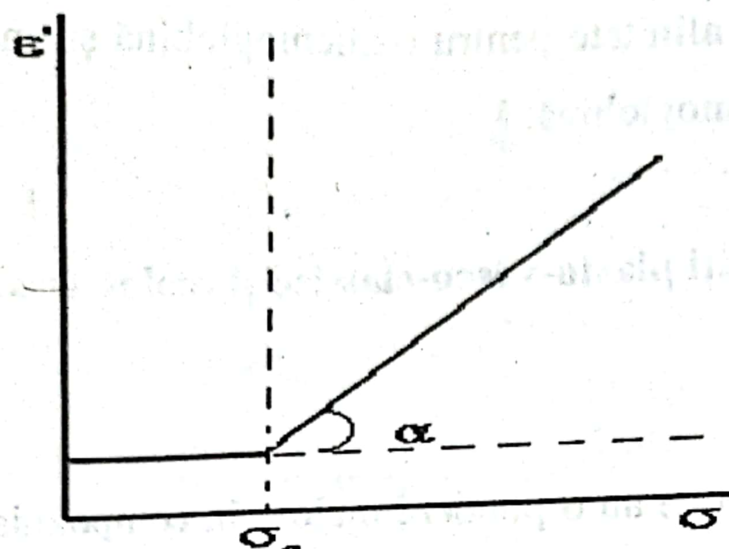


Figura 80. - Reprezentarea grafică a relației dintre constrângere (efort unitar) și deformația relativă descriu proprietățile plasto – vâsco - elastice ale sângelui (modificat după F. Gremy și J. Perrin 1975)

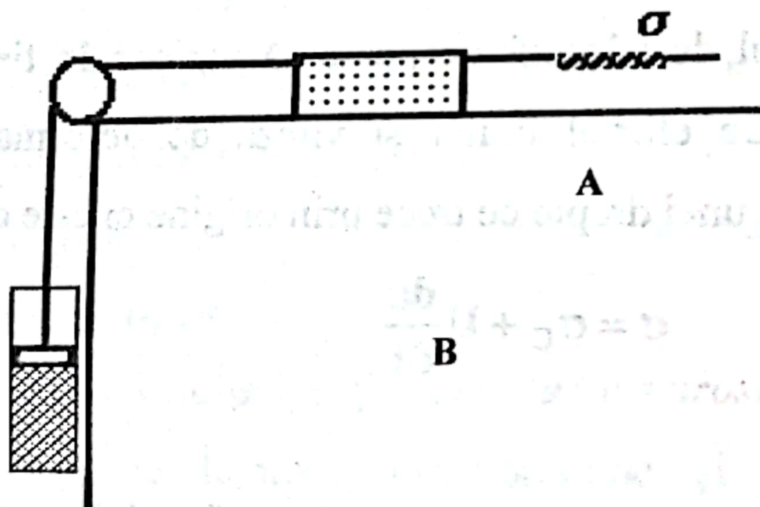


Figura 81. - Modelul mecanic propus pentru descrierea comportamentului mecanic al sângelui: corpul A din sistem se deplasează cu frecare sub acțiunea unei forțe aplicate prin intermediul unui resort elastic iar corpul B din sistem se deplasează cu frecare în interiorul unui lichid vâscos, newtonian (modificat după F. Gremy și J. Perrin 1975)

Comportarea reologică poate fi descrisă prin cea a sistemului alcătuit dintr-un corp de tip amortizor (un disc ce se mişcă într-un lichid vâscos, newtonian), conectat printr-un fir inextensibil şi netorsionabil cu un corp rigid ce se deplasează cu frecare pe o suprafaţă plană sub acţiunea unei forţe ce se exercită prin intermediul unui resort.

Forţa ce acţionează asupra resortului poate produce deplasarea sistemului de corpuri numai după ce efortul unitar depăşeşte valoarea critică, astfel că înainte de atingerea acestei valori avem numai deformarea elastică a resortului (Figura 81).

După depăşirea valorii critice efortul unitar are două componente, cea constantă (valoarea critică) şi cea proporţională cu viteza de deplasare a sistemului de corpuri, depinzând şi de rezistenţa lichidului newtonian.

13.3. Legea lui Bernoulli şi numărul lui Reynolds pentru curgerea sangvină

Curgerea sangvină se efectuează cu viteze diferite în funcţie de diametrul vaselor de sânge străbătute, numărul lui Reynolds având valori destul de mici pentru majoritatea acestor vase ceea ce corespunde unei curgeri laminare. Excepţie poate

face aorta ascendentă, al cărei diametru de câţiva cm este de natură să favorizeze uneori o curgere turbulentă (Tabelul 10).

Sângele reprezintă în acelaşi timp o soluţie apoasă de ioni şi molecule, dar şi o suspensie de celule, evidenţiabil prin intermediul profilului liniilor de curent la curgerea staţionară: celulele curg cu viteză constantă (Figura 82) printr-un 'tub' central, iar plasma sangvină la periferie curge cu viteze mai mici. Gradientul de viteze scade către pereţii vasului.

Deşi nu se respectă legea lui Poisseulle, se verifică legea lui Bernoulli şi ecuaţia de continuitate, demonstrată prin cateterism vascular şi prin tehnica marcherilor radioactivi.

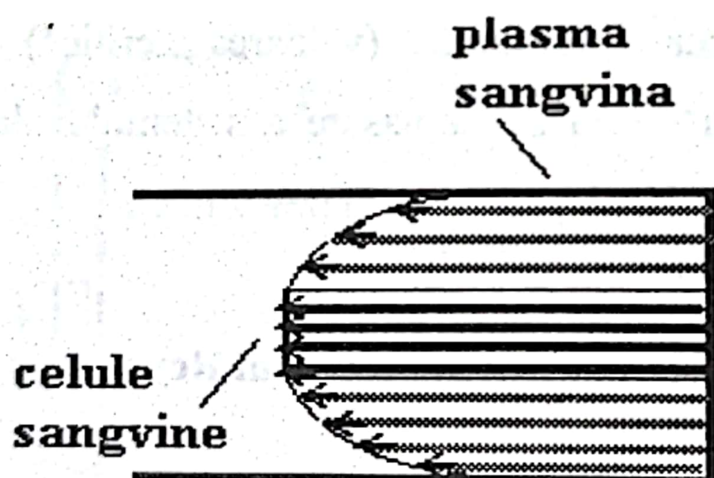


Figura 82.- Vitezele de curgere laminară a sângelui prin vasele sangvine scad de la centru spre pereţi după un profil parabolic (corespunzător plasmei sangvine) dar sunt constante şi maxime în tubul central de linii de curent care corespunde curgerii elementelor figurate (după F. Gremy şi J. Perrin 1975).

Tabelul 10. - Diametrele vaselor sangvine şi vitezele de curgere laminară a sângelui (după F. Gremy şi J. Perrin 1975)

Vasul sangvin	Diametrul (cm)	Viteza maximă (cm/s)	Numărul lui Reynolds
Capilare	0,0005-0,001	0,05-0,1	0,01
Vene	0,5-1,0	15-20	400
Vena cavă	2,0	10-15	700
Artere	0,2-0,6	20-50	400
Aorta ascendentă	2,0-3,2	60	4500
Aorta descendentă	1,6-2,0	30	1500

$$\mathbf{P + \rho g z + \frac{1}{2}\rho v^2 = X - E = const.} \qquad (135)$$

$$\mathbf{vs = v's'}$$

unde: **P** este presiunea hidrostatică, ρ este densitatea, **v** este viteza de curgere, **z** este altitudinea iar **E** este pierderea de energie pe unitatea de volum cauzată de frecările interne (vâscozitate) şi regăsită îndeosebi sub formă de căldură, **v** şi **v'** sunt vitezele prin două secţiuni cu suprafeţele transversale **s** şi **s'**.

În legătură cu proprietăţile reologice ale sângelui, trebuie de menţionat că, apa cu ionii şi moleculele mici dizolvate în ea (care constituie *serul sangvin* împreună cu

macromoleculele prezente) se comportă, în primă instanță ca un lichid newtonian (la care vâscozitatea nu depinde de timp sau de constrângerea aplicată).

13.4. Semnificația fizică a presiunii hidrostatice a sângelui. Tensiunea arterială

Presiunea hidrostatică a sângelui este o presiune radială (transmurală) dată de diferența de presiune între presiunea intravasculară P_{iv} și cea extravasculară, tisulară P_{ev}:

$$P = P_{iv} - P_{ev} > 0 \tag{136}$$

În pereții vaselor sangvine se exercită eforturi unitare circumferențiale, T_c, datorate proprietăților elastice ale acestora (Figura 83).

Din aplicarea principiului lucrului mecanic virtual se poate scrie egalitatea între lucrul mecanic **Lp** efectuat de **P** la o modificare **dr** a razei și lucrul mecanic L_T efectuat de tensiunea circumferențială T_c la modificarea corespunzătoare a circumferinței:

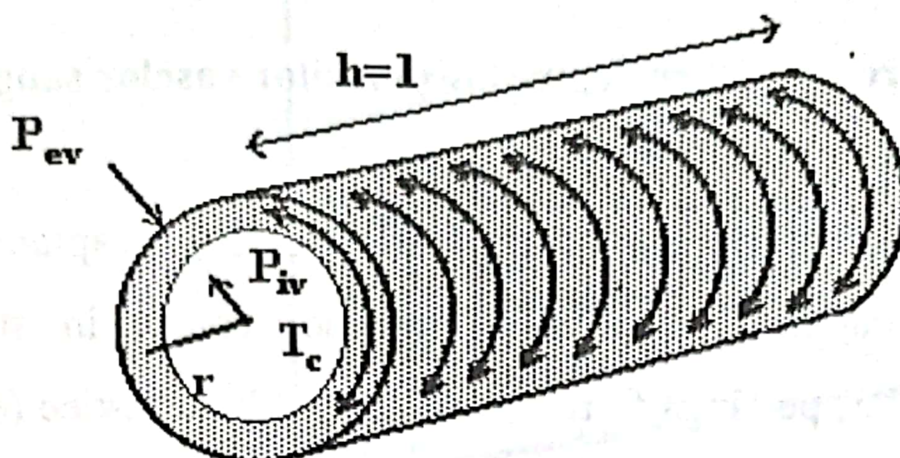


Figura 83. - Asupra pereţilor unui vas sangvin se exercită presiunea extravasculară, P_{ev}, presiunea intravasculară, P_{iv} şi tensiunea circumferenţială, T_c (după F. Gremy şi J. Perrin 1975).

$$P\,2\pi\,rhdr = T_C\,2\pi\,dr \qquad (137)$$

de unde:

$$Pr = T_c \qquad (138)$$

Măsurătorile arată că presiunea hidrostatică din vene este sensibil mai mică decât în artere dar raza unei secţiuni venoase este mai mare decât pentru o aortă astfel că tensiunea circumferenţială este de acelaşi ordin de mărime în ambele cazuri.

13.5. Proprietăți reologice ale pereților vaselor sangvine

Cu excepţia capilarelor şi sfincterelor precapilare, toate vasele sangvine (arteriale şi venoase) conţin în structura pereţilor lor, pe lângă fibre musculare şi fibre elastice (elastină şi colagen). Luate separat, elastina şi colagenul se comportă ca nişte corpuri Hooke (perfect elastice) cu module Young diferite (elastina este cea mai elastică, cu un modul de elasticitate de 6 ori mai mare decât al cauciucului). În constituţia pereţilor vaselor sangvine (Figura 84) ele se comportă însă ca nişte corpuri Kelvin (vâsco - elastice, cu histerezis - deformaţie remanentă).

Curba constrângere-deformaţie [$T_c(r)$] obţinută prin degradarea elastinei cu tripsină (deci pentru colagen) are o pantă mai mare decât cea obţinută pentru elastină, prin degradarea colagenului cu acid formic. Curba corespunzătoare peretelui vascular are o alură intermediară, frântă.

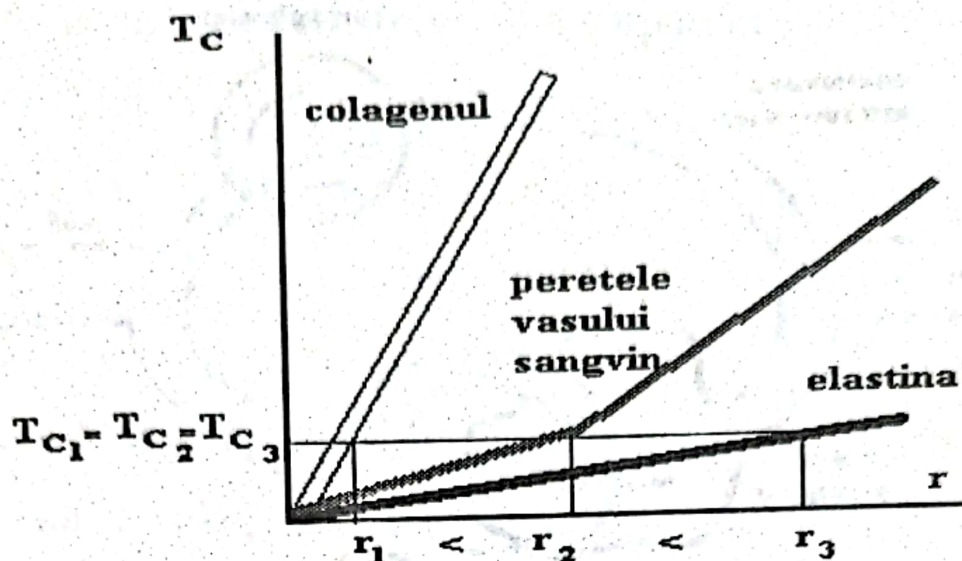


Figura 84. - Ilustrarea calitativă a proprietăţilor elastice ale pereţilor vaselor sangvine comparativ cu elastina şi colagenul. La aceeaşi tensiune circumferenţială, *Tc*, deformaţia, *r*, a elastinei este mai mare ca cea a peretelui vasului sangvin şi mult mai mare decât cea a colagenului (modificat după F. Gremy şi J. Perrin 1975)

13.6. Anastomoza artero-venoasă

La nivelul anastomozei artero-venoase întâlnim formaţiuni de tipul sfincterelor precapilare şi a corpilor glomici care sunt constituite în principal din elemente structurale musculare şi aproape complet lipsite de proprietăţi elastice.

Anastomoza artero-venoasă şuntează joncţiunea capilarelor arteriale cu cele venoase asigurând optimizarea funcţiei sângelui de hrănire a ţesuturilor periferice vascularizate (Figura 85).

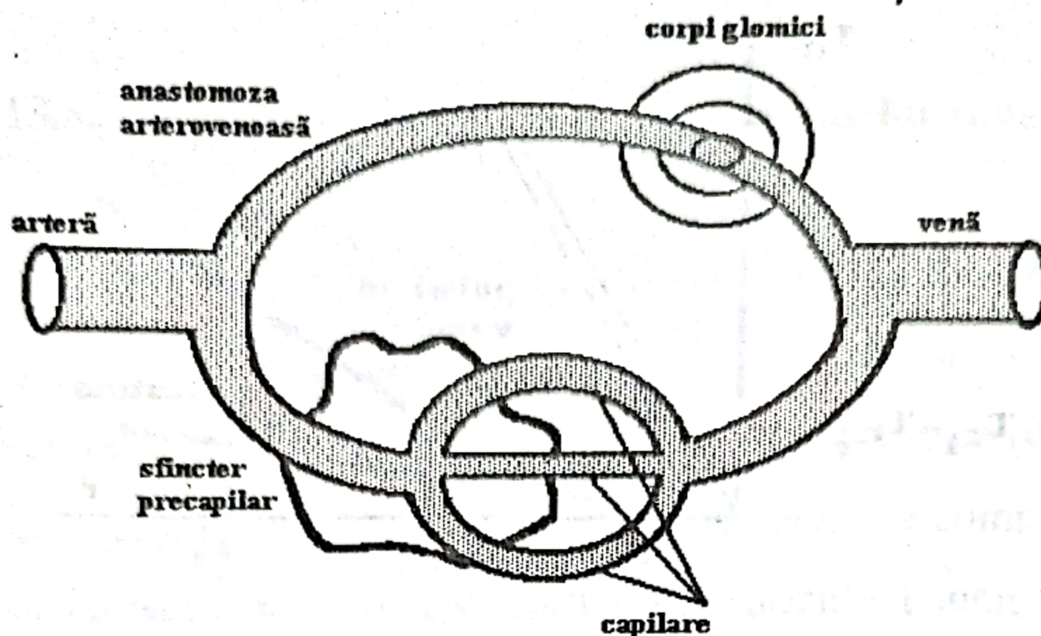


Figura 85.- Anastomoza artero-venoasă (modificat după J. Gremy şi F. Perrin 1971).

Sângele este dirijat prin anastomoza artero-venoasă ca urmare a contractării sfincterelor precapilare şi relaxării corpilor glomici. Când sfincterele precapilare se relaxează atunci sângele circulă prin capilare, anastomoza artero-venoasă fiind închisă de corpii glomici (Baran D. şi Topoliceanu F., 1999).

13.7. Elasticitatea şi histerezis

Explicarea proprietăţilor vâsco-elastice ale sângelui, pe de o parte, şi ale pereţilor vaselor sangvine, pe de altă parte, necesită prezentarea deosebirilor dintre reologia corpurilor de

acest fel numite corpuri Kelvin şi a corpurilor elastice - corpuri Hooke - (Figura 86).

În cazul corpurilor elastice , comportarea deformaţiei la variaţia constrângerii se poate reprezenta ca în figura de mai jos. Când constrângerea (efortul unitar, σ) creşte de la zero (punctul A) atunci şi deformaţia relativă ε creşte proporţional (legea lui Hooke) din zero până în punctul B. Scăderea constrângerii pornind din punctul B până la valoarea iniţială zero conduce la scăderea deformaţiei *pe acelaşi drum* până la aceeaşi valoare de zero.

Variaţia în sens opus a constrângerii, din A în E implică variaţia în sens opus a deformaţiei după o dreaptă cu aceeaşi pantă ca în primul caz. Revenirea constrângerii la punctul de zero este însoţită de revenirea deformaţiei la punctul de zero *pe acelaşi drum*. Întreaga energie mecanică preluată de corp sub formă de energie de deformaţie elastică este restituită în final.

În cazul corpurilor Kelvin avem de-a face cu o elasticitate cu histerezis adică o parte din energia mecanică transmisă corpului sub formă de energie de deformaţie elastică se transformă în energie calorică. Este vorba tocmai de suprafaţa închisă de curba care descrie variaţia deformaţiei relative la variaţia constrângerii. Să vedem cum se ajunge la această curbă poligonală închisă.

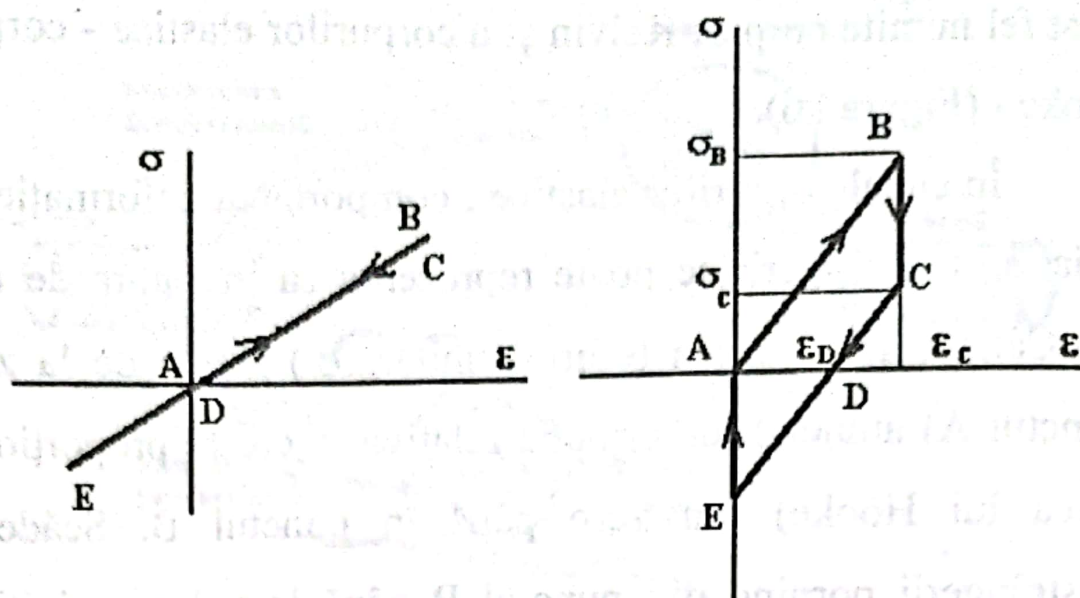


Figura 86. - Comportarea unui corp Hooke în comparaţie cu un corp Kelvin (J. Gremy şi F. Perrin 1975).

După ce ajunge la valoarea σ_B constrângerea începe să scadă pe porţiunea BC dar deformaţia nu scade ci rămâne la valoarea ε_C. Din punctul B constrângerea continuă să scadă de la valoarea σ_C până la zero antrenând de această dată şi scăderea deformaţiei de la ε_C până la valoarea σ_D diferită de zero. Pentru ca şi deformaţia relativă să revină la valoarea iniţială nulă trebuie aplicată o constrângere de sens opus (porţiunea DE). Valoarea nulă a deformaţiei relative obţinută prin aceste transformări se păstrează pe durata readucerii la zero a constrângerii (porţiunea EA).

În concluzie, o parte din energia furnizată de pompa cardiacă pentru dirijarea circulaţiei sângelui prin sistemul de

vase sangvine se transferă pereţilor vaselor sangvine sub formă de energie termică (se disipă). O descriere completă a proprietăţilor reologice ale acestor corpuri vâsco-elastice, care prezintă nu numai o constantă de elasticitate dar şi una de vâscozitate ar necesita şi o curbă de relaxare $\sigma = f(t)$ corespunzătoare unei deformaţii ce variază dreptunghiular precum şi o curbă de fluenţă $\varepsilon = g(t)$corespunzătoare unei constrângeri cu variaţie dreptunghiulară.

Menţionăm încă o dată că şi membrana eritrocitară este descriptibilă prin intermediul unei combinaţii de corpuri elastice şi vâscoase care explică într-o primă aproximaţie comportamentul său în timpul curgerii sângelui prin capilare (deformabilitatea) şi se leagă de forma sa biconcavă (Figura 87) care este susţinută, desigur şi de citoscheletul format dintr-o reţea fibrilară macromoleculară ataşată în anumite puncte la membrana eritrocitului.

În această reţea fibrele de actină sunt bine reprezentate, determinând proprietăţi similare cu cele ale corpilor glomici şi sfincterelor precapilare.

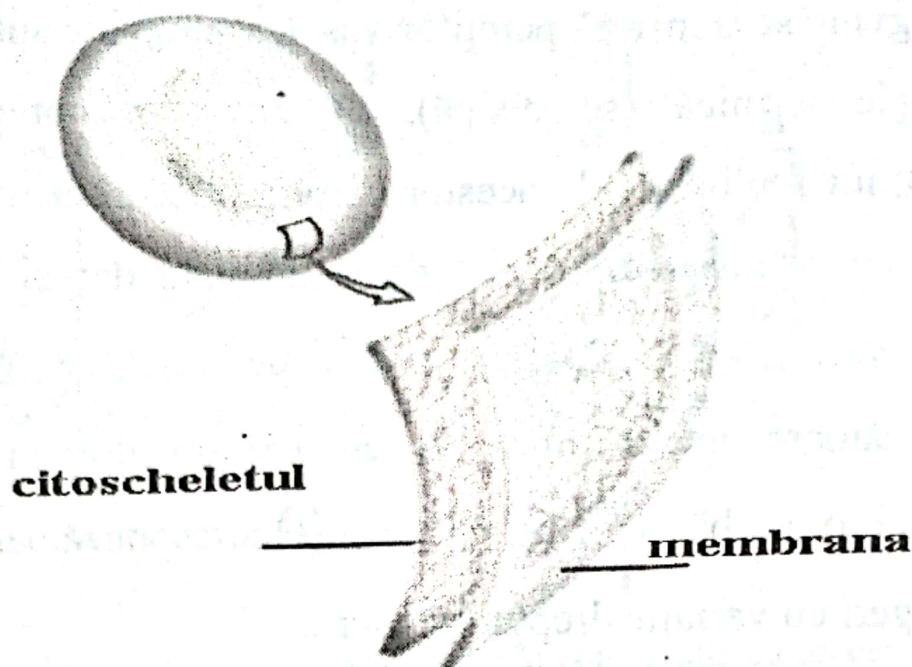


Figura 87.- Forma biconcavă şi deformabilitatea eritrocitului sunt asigurate de proprietăţile vâscoelastice ale membranei precum şi de existenţa citoscheletului (J. Darnell şi .col. 1990)

13.8. Impedanţa vasculară la curgerea sangvină

În modelarea matematică a curgerii sangvine se poate considera *'pompa cardiacă'* acţionând cu o forţă ritmică pentru întreţinerea pulsării sângelui în vasele sangvine. Proprietăţile de elasticitate ale acestora permit analogia cu un balon de cauciuc cu un gât rigid, umplut cu un lichid incompresibil (Figura 88). Se notează cu **S** secţiunea transversală a gâtului, cu **V** volumul balonului, cu **Δp** variaţia de presiune aplicată la nivelul secţiunii **S**. Variaţia de volum corespunzătoare dilatării pereţilor sangvini se notează cu **v**. Dacă se respectă legea lui

Hooke (manifestarea proprietăţilor de elasticitate perfectă) atunci se poate scrie:

$$\Delta p = E\varepsilon \qquad (139)$$

unde: Δp reprezintă efortul unitar, σ iar ε este deformarea relativă adică:

$$\varepsilon = \frac{v}{V} = \frac{\Delta p}{E} \qquad (140)$$

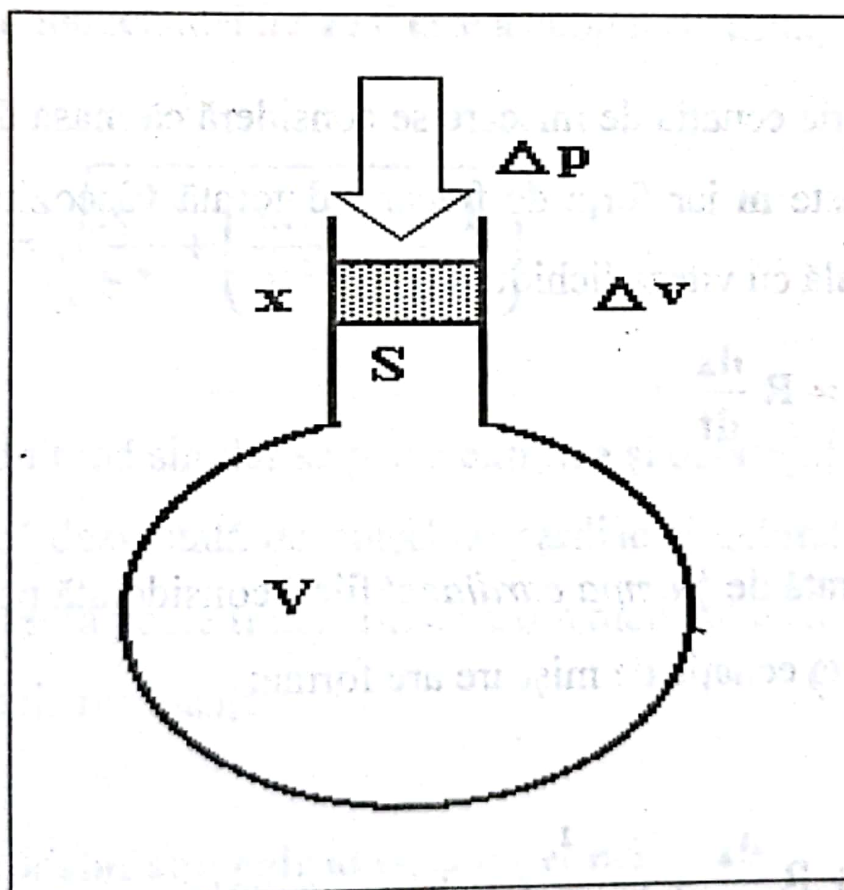


Figura 88. - Reprezentarea simbolică a proprietăţilor elastice ale vaselor sangvine (după F. Gremy şi J. Perrin 1975)

Variaţia de volum a balonului corespunde scăderii nivelului lichidului din gâtul balonului cu **x**:

$$v = Sx \tag{141}$$

Ca urmare a proprietăţilor elastice ale balonului, apare forţa de retragere f_R astfel că:

$$f_R = -\Delta pS = -\frac{ExS^2}{V} \tag{142}$$

Pentru a scrie ecuaţia de mişcare se consideră că masa de lichid deplasată este **m** iar forţa de frecare, datorată vâscozităţii este proporţională cu viteza lichidului:

$$f_\eta' = R\frac{dx}{dt} \tag{143}$$

Forţa eliberată de *'pompa cardiacă'* fiind considerată periodică, de pulsaţie ω ecuaţia de mişcare are forma:

$$m\frac{d^2x}{dt^2} + R\frac{dx}{dt} + \frac{ES^2}{V}x = F_{max}\cos\omega t \tag{144}$$

Comparând cu ecuaţia de la circuitul RLC serie, alimentat de o sursă de tensiune alternativă:

$$L\frac{dI}{dt} + RI + QU_C = U_m \cos\omega t \qquad (145)$$

se poate observa că, impedanţa la curgerea sangvină are o formă perfect analogă cu cea din electricitate dacă se împart toţi termenii cu S^2, adică R/S^2 este analogul rezistenţei, m/S^2 este analogul inductanţei iar E/V este analogul capacităţii electrice:

$$|Z| = \sqrt{\frac{R^2}{S^4} + \left(\frac{m\omega}{S^2} - \frac{E}{V}\frac{1}{\omega}\right)^2} \qquad (146)$$

În mod similar se poate exprima şi defazajul dintre forţa periodică dezvoltată de muşchiul cardiac şi debitul sangvin (a cărui măsură poate fi deplasarea **x** din modelul de mai sus) ca şi condiţia de rezonanţă.

13.9. Modelul analogic al circulaţiei sangvine

Unul din primele şi cele mai simple modele ale circulaţiei sangvine este totuşi diferit de circuitul RLC serie

căci este de fapt un circuit mixt şi prezintă doi condensatori (Figura 89). Ca urmare a existenţei impedanţei vaselor sangvine după modelul de mai sus, forţa motrice a curgerii sangvine apare ca o funcţie armonică ce a suferit o redresare monoalternanţă şi o netezire datorată elementelor capacitive.

Elementele capacitive reprezintă deformabilitatea remanentă a pereţilor arterelor - aceştia sunt capabili să stocheze o parte din energia de deformaţie în timpul circulaţiei

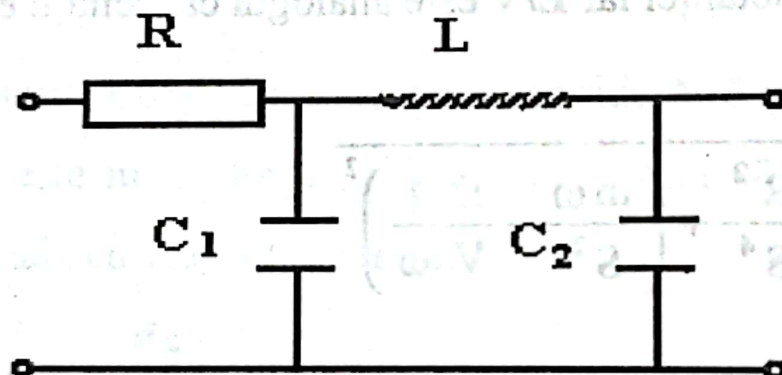


Figura 89. - Model fizic al impedanţei la curgerea sangvină în accepţia analogiei cu circulaţia unui curent electric printr-un circuit mixt (J. Gremy şi F. Perrin 1975).

sângelui de la o ejecţie sistolică şi să o restituie parţial când elementul inductiv (inerţia masei sangvine) începe să frâneze debitul arterial.

Ritmul cardiac prezentând o sistolă şi o diastolă presiunea sangvină va înregistra alternativ o presiune sistolică

(mai amplă) şi una diastolică (mai redusă). (Figura 90) Presiunea medie pentru o perioadă, T, este:

$$P_m = \frac{1}{T}\int_0^T P dt \cong \frac{P_{sist} + 2P_{diast}}{3} \qquad (147)$$

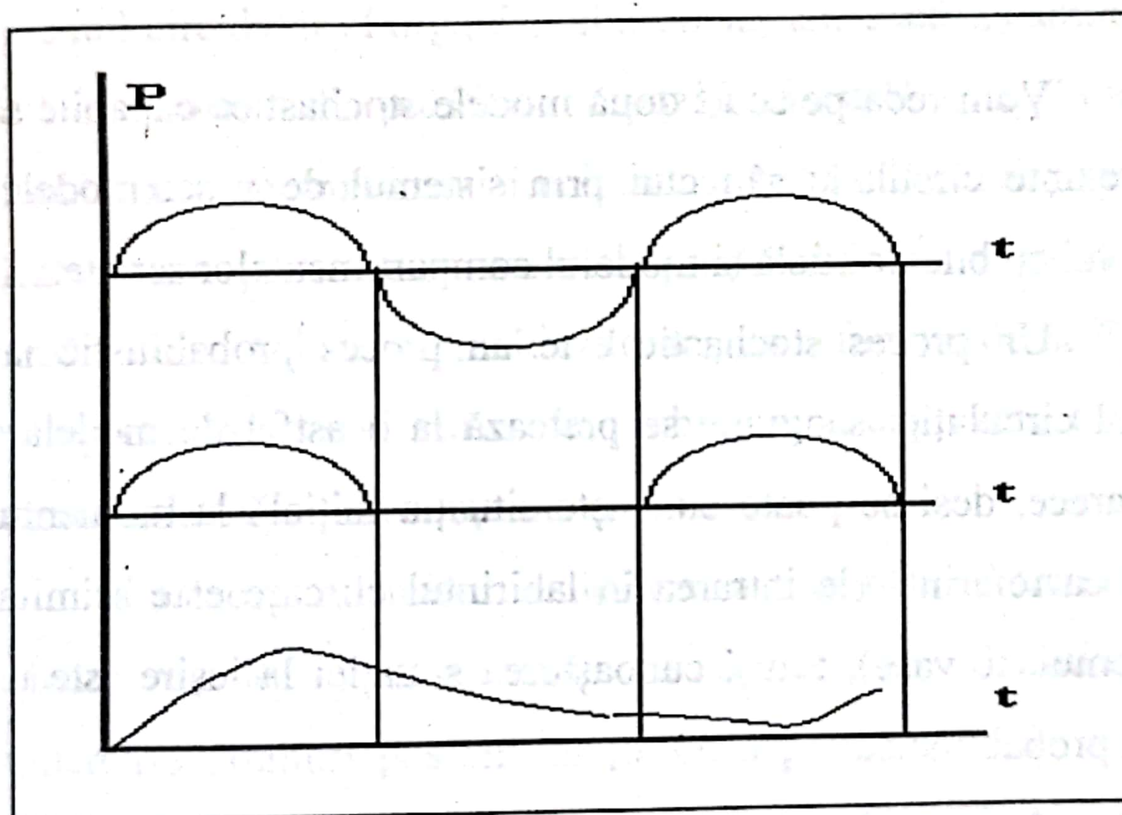


Figura 90. - Presiunea periodică exercitată de pompa cardiacă se transformă într-un 'semnal' redresat şi netezit ca urmare a existenţei impedanţei de curgere a sângelui (după F. Gremy şi J. Perrin 1975).

Dintre funcţiile complexe îndeplinite de acest lichid circulant esenţial pentru organismele animale superioare, am

menţionat deja transportul oxigenului şi bioxidului de carbon între ţesutul pulmonar şi celelalte ţesuturi şi amintim funcţia de transport a substanţelor nutritive şi a celor eliminate de organism, funcţia de stabilizare a concentraţiilor ionice, funcţia de termostaziere, etc.

13.10. Studiul circulaţiei sangvine cu ajutorul trasorilor

Vom reda pe scurt două modele stochastice capabile să reprezinte circulaţia sângelui prin sistemul de vase: modelul tubului cu bile de sticlă şi modelul compartimentelor seriate.

Un proces stochastic este un proces probabilistic iar cazul circulaţiei sangvine se pretează la o astfel de modelare deoarece, deşi se poate cunoaşte situaţia iniţială la momentul luat ca referinţă (la intrarea în labirintul cu care este asimilat sistemul de vase), totuşi cunoaşterea situaţiei la ieşire este un fapt probabilistic.

Aceasta deoarece există un mare număr de vase prin care se poate dirija masa de lichid luată în studiu - marcată cu ajutorul unui trasor - şi determinarea poziţiilor în care se vor găsi particulele de lichid marcat la ieşire necesită o analiză probabilistică - singura capabilă să ajute la prezicerea funcţiei lor de distribuţie.

În *modelul tubului cu bile de sticlă* (care se poate realiza ca atare relativ uşor) , se consideră că lichidul marcat cu trasor colorat, de exemplu, este introdus la momentul iniţial la unul din capetele tubului (capătul A). În momentul injectării această masă de lichid ocupă o zonă densă, relativ restrânsă şi omogenă.

Un lichid incolor (simbolizând plasma sangvină din sistemul circulator al organismului uman) antrenează cantitatea de lichid colorat din poziţia A în poziţia B astfel că deplasarea globală, **x**, a centrului zonei colorate, este rezultatul deplasării aleatorii ale particulelor colorate printre bilele de sticlă. O curbă a densităţii de particule colorate, ca o funcţie de **x**, **F(x)**, va reprezenta tocmai curba de probabilitate a prezenţei unei particule de trasor într-un punct de abscisă **x.**

La începutul mişcării aleatorii a trasorului antrenat de lichidul incolor printre bilele de sticlă care delimitează numeroase drumuri posibile majoritatea particulelor de trasor sunt plasate pe o distanţă relativ mică (dispersie redusă) astfel că probabilitatea de a găsi o particulă în zona de la începutul tubului este relativ mare. Numai un număr mic de particule colorate reuşesc să ajungă la distanţe mai mari de capătul de intrare, astfel că probabilitatea de a găsi la distanţă mare o particulă colorată este relativ mică. Deci curba de probabilitate

este asimetrică, având maximul deplasat spre valorile mici ale lui **x** (curbă de tip Poisson).

Cu timpul, particulele colorate care ajung la distanţe medii creşte iar un număr relativ mic rămân poziţionate atât la distanţe mici cât şi la distanţe mari. Deci curba de distribuţie spaţială devine o curbă simetrică (tinde la o curbă Gaussiană). Axa de simetrie a curbei se deplasează cu viteză constantă în lungul tubului.

În *modelul compartimentelor înseriate* se consideră că sistemul circulator este alcătuit dintr-un număr foarte mare de compartimente identice legate în serie (Newman şi col. citaţi de F. Gremy, 1982). Pentru a urmări modul cum se deplasează sângele într-un astfel de sistem se introduce o cantitate de trasor în primul compartiment urmând ca particulele marcate să încerce să treacă în compartimentul al doilea şi apoi mai departe.

Tentativele de trecere dintr-un compartiment în altul reuşesc numai cu o anume probabilitate.

Starea staţionară spre care tinde sistemul este caracterizată de cantitatea de substanţă **S** în fiecare compartiment.

Utilizarea unui trasor radioactiv, pentru acest sistem de detecţie a radiaţiei, se urmăreşte circulaţia lichidului marcat prin intermediul activităţii specifice:

$$a_i(t) = \frac{s_i(t)}{S} \tag{148}$$

unde: **i** desemnează compartimentul iar s_i este cantitatea de trasor (substanţă marcată) din compartimetul respectiv.

Ecuaţia diferenţială care descrie cinetica trasorului este de forma:

$$\frac{ds_i(t)}{dt} = \rho a_{i-1} - \rho a_i \tag{149}$$

Ecuaţia arată că viteza de creştere a cantităţii de trasor din compartimentul considerat creşte proporţional cu cantitatea existentă în compartimentul precedent şi scade proporţional cu cantitatea din compartimentul considerat, ρ fiind viteza de refacere (de *turn - over*). Rezultă imediat că:

$$S\frac{da_i(t)}{dt} = \frac{\rho}{S}(a_{i-1} - a_i) \tag{150}$$

Se poate demonstra prin metoda inducţiei matematice că:

$$a_i(t) = \frac{a_{(0)}}{(i-1)!}\left(\frac{\rho t}{S}\right)^{i-1} e^{-\frac{\rho}{S}t} \tag{151}$$

unde: simbolul '!' reprezintă operaţia de *'factorial'*. Într-adevăr să verificăm relaţia pentru **i=1, i=2**, ...:

(1) **i=1** arată că:

$$a_i(t) = \frac{a_{(0)}}{1} e^{-\frac{\rho}{S}t} \tag{152}$$

adică:

$$\frac{da_1}{dt} = -\frac{\rho}{S} a_{(0)} e^{-\frac{\rho}{S}t} \tag{153}$$

(2) **i=2** arată că:

$$a_2(t) = \frac{a_{(0)}}{1!}\frac{\rho t}{S} e^{-\frac{\rho}{S}t} \tag{154}$$

adică:

$$\frac{da_2}{dt} = \frac{\rho}{S} a_{(0)} e^{-\frac{\rho}{S}t} - \left(\frac{\rho}{S}\right)^2 t.e^{-\frac{\rho}{S}t} = \frac{\rho}{S}\left(a_1(t) - a_2(t)\right) \qquad (155)$$

şi aşa mai departe. În fine, acest mod de demonstraţie presupune că dacă relaţia este valabilă pentru un **i** dat atunci se demonstrează că ea este valabilă pentru **i+1.**

Formal relaţia propusă este de tipul distribuţiei Poisson:

$$P_{(p)} = \frac{e^{-x} x^p}{p!} \qquad (156)$$

unde: $P_{(p)}$ este probabilitatea de a se obţine **p** încercări reuşite în condiţiile în care numărul mediu (medie pe ansamblu) de încercări reuşite este egal cu **x.**

Pentru **i-1** mic (puţine compartimente de străbătut - puţine încercări **p** care garantează efectul scontat) (ca şi în cazul când, în modelul precedent trasorul colorat străbate o distanţă mică - cazul A) forma unei astfel de curbe este puternic asimetrică.

Ulterior când **i-1** este mai mare, forma curbei de distribuţie tinde să devină simetrică corespunzător (ca şi în

modelul precedent - cazul B) unui **p** mare (mai multe particule marcate reuşesc să ajungă în compartimentul considerat).

Cercetările întreprinse de grupul de lucru iniţiat la Iaşi de regretatul Academician Petre Jitariu şi continuate ulterior de colectivul Laboratorului de Biofizică condus de profesorul Mihail Isac, au acordat un loc aparte investigaţiilor asupra celulelor sangvine, urmărind efectele acţiunii unor factori fizici de natură magnetică (P. Jitariu şi col. 1967; M. Jitariu şi col. 1965; P. Jitariu şi M. Isac 1967; P. Jitariu, M. Jitariu şi M. Isac 1967; M. Jitariu şi col. 1970).



CAPITOLUL 14

Aspecte biofizice ale schimburilor de gaze respiratorii

Dacă la *organismele unicelulare* schimbul de gaze, respectiv O_2 şi CO_2, cu mediul înconjurător, se efectuează prin simpla *difuzie* a acestora *prin membrana celulară.*

La *organismele pluricelulare*, încep să se diferenţieze "aparate" specializate care fac posibilă *fixarea oxigenului pe lichidul circulant sangvin, transportul lui la ţesuturi, preluarea dioxidului de carbon şi eliminarea acestuia în afara organismului.*

La nevertebrate gazele respective se dizolvă direct în lichidul circulant, în timp ce la vertebrate ele se combină cu hemoglobina aflată numai în celulele lichidului circulant.

Structura aparatului respirator diferă după tipul organismului - la animalele superioare, vertebrate, s-au dezvoltat plămânii.

Plămânii comunică cu exteriorul prin căile respiratorii, care sunt reprezentate de: *cavităţile nazale, laringe, trahee şi*

bronhii prin care aerul ajunge la plămâni. Fiecare din cele două bronhii se ramifică în 15 sau mai multe *bronhiole* care, la rândul lor se ramifică într-o serie de *canalicule alveolare* ce au ca terminaţii unele formaţiuni microscopice saciforme, numite *alveole pulmonare*.

Alveola pulmonară este formată dintr-o *membrană subţire de ţesut conjunctiv* şi elastic. Prin interior este captuşită cu un *strat epitelial alveolar* de tip lamelar. În peretele alveolar se găsesc numeroase *capilare sangvine* separate de alveolă numai printr-un strat subţire de *endoteliu* (barieră monocelulară semipermeabilă) din care sunt alcătuiţi pereţii vaselor capilare. Datorită grosimii foarte mici a membranei care separă aerul din alveola de sânge (0,4 μm) cât şi numărului mare de alveole (300 milioane) se realizează o suprafaţă de contact foarte mare (90 m^2) astfel că cei aproximativ 70 ml de sânge care înconjoară alveolele să fie încărcaţi cu oxigen şi eliberaţi de dioxid de carbon în mai puţin de 1 secundă.

În *sângele arterial*, concentraţia gazelor este aceeaşi ca şi în aerul alveolar. În *sângele venos* concentraţiile şi presiunile parţiale ale oxigenului şi dioxidului de carbon sunt diferite determinând difuzia oxigenului din alveole în sangele venos şi a dioxidului de carbon din sângele venos în alveole, de unde este eliminat prin expiraţie. *Transportul acestor gaze prin*

ansamblul format de endoteliul capilar şi epiteliul alveolar este echivalent cu difuzia printr-o membrană de 2-3 nm.

14.1. Parametrii schimbului pulmonar de gaze

Parametrii schimbului de gaze de la nivelul ţesutului pulmonar sunt:

(a) ventilaţia alveolară -(v_a) : volumul de gaz (ΔV)transportat prin convecţie de la exterior spre alveole şi revers în unitatea de timp (Δt):

$$v_a = \frac{\Delta V}{\Delta t} \tag{157}$$

(b) capacitatea de difuzie -(c_d) : volumul de oxigen sau bioxid de carbon schimbat între amestecul de gaz alveolar şi sângele din capilarele plămânului în unitatea de timp pe unitatea de presiune parţială (p_A):

$$c_d = \frac{\Delta V}{\Delta t \Delta p_A} \tag{158}$$

(c) perfuzia -(d_v): volumul de sânge care trece prin rețeaua de capilare a plămânului în unitatea de timp:

$$\mathbf{d_v = \frac{\Delta V}{\Delta t}} \tag{159}$$

(d) distribuția - neomogenitățile locale ale celor trei parametri de mai sus în interiorul plămânului.

Ventilația alveolară se referă la cantitatea din aerul inspirat care ajunge efectiv să participe la schimbul de gaze de la nivelul alveolelor. Pentru un adult normal în stare de repaus fizic volumul total inspirat în unitatea de timp este de circa 7 litri / minut din care 70% ajunge la alveole, adică ventilația alveolară este de 5 litri / minut.

Presiunile parțiale ale oxigenului și bioxidului de carbon sunt:

$$p_{AO_2} = p^i_{O_2} - 115\,\frac{\dot{V}_{O_2}}{\dot{V}_A}$$
$$p_{ACO_2} = 115\,\frac{\dot{V}_{CO_2}}{\dot{V}_A} \tag{160}$$

unde V reprezintă debitele volumice de oxigen sau bioxid de carbon în condiții standard (presiunea de 1 atmosferă și temperatură de zero grade Celsius) sau ventilația alveolară în

condiţii fiziologice iar $P^{i}{}_{O_2}$ este presiunea parţială a oxigenului inspirat.

Deci o creştere în ventilaţia alveolară duce la o creştere a presiunii parţiale a oxigenului din aerul alveolar. Deoarece hemoglobina din sânge este saturată cu oxigen creşterea ventilaţiei alveolare nu creşte efectiv cantitatea de oxigen care ajunge la ţesuturi.

În schimb scăderea presiunii bioxidului de carbon din aerul alveolar duce la o eliberare mai mare de bioxid de carbon şi o reducere a presiunii parţiale a acestui gaz urmată de o creştere a valori pH - ului.

Presiunile parţiale ale bioxidului de carbon din aerul alveolar şi din sângele venos sunt diferite substanţial: 5,3 kPa (40 mmHg), respectiv 6,1 kPa (46 mmHg). La fel şi cele ale oxigenului: 13,3 kPa (100 mmHg), respectiv 5,3 kPa (40 mmHg). Aceste diferenţe de presiune determină difuzia gazelor respiratorii la trecerea sângelui prin capilare. Având în vedere că gazele sunt transportate de hemoglobina din eritrocite, rezistenţele întâmpinate de procesul de difuzie sunt date de epiteliul alveolar, interstiţiul, endoteliul capilar, plasma sangvină, interiorul eritrocitului. Difuzia este guvernată de legea Fick (enunţată într-un capitol anterior):

$$j = -\ DgradC \qquad (161)$$

unde **j** este fluxul (cantitatea de substanţă în unitatea de timp), **grad C** este gradientul concentraţiei pe direcţia difuziei iar **D** este coeficientul de difuzie. Conform legii lui Henry, între concentraţie şi presiunea parţială există relaţia:

$$C = \alpha P \qquad (162)$$

în care coeficientul de solubilitate α este constant pe spaţiul de difuzie. Introducând coeficientul lui Krogh sau conductivitatea de difuzie:

$$K = \alpha D \qquad (163)$$

se obţine:

$$j = -\ KgradP \qquad (164)$$

Exprimând fluxul de oxigen difuzat ca volumul ce trece în unitatea de timp prin unitatea de suprafaţă, avem:

$$\dot{V}_{O_2} = KS\ \frac{\partial P_{O_2}}{\partial x} \qquad (165)$$

Trecând la variaţii finite pe distanţa Δx dintre spaţiul alveolar şi capilarul pulmonar găsim capacitatea de difuzie:

$$c_{dO_2} = \frac{\dot{V}_{O_2}}{\Delta p_{AO_2}} = \frac{KS}{\Delta x} \qquad (166)$$

La un adult normal la care captarea oxigenului se face în ritmul de 300 ml/min şi presiunile parţiale ale oxigenului sunt cele de mai sus se obţine o capacitate de difuzie de 230 ml/min kPa.

Perfuzia este practic dictată de ritmul cardiac. Numai o mică parte a sângelui (1-2 %) nu trece prin ţesutul pulmonar ajungând din vene direct în artere. Acest sânge scurtcircuitat poate fi în proporţie mai mare în unele cazuri patologice, o scădere în presiunea parţială a oxigenului şi o creştere a presiunii parţiale a bioxidului de carbon producându-se în artere. În repaus, la adultul normal perfuzia sângelui ajunge la 5 litri / minut. Schimbul de gaze este favorizat la nivelul acelor eritrocite care îşi accentuează convexitatea ca urmare a proprietăţilor lor de deformabilitate la trecerea prin capilare foarte înguste.

Distribuţia valorilor mărimilor fizice prezentate mai sus prezintă neomogenităţi considerabile chiar pentru un organism perfect sănătos iar în situaţii patologice este de aşteptat amplificarea lor, ceea ce duce în principal la scăderea presiunii parţiale a oxigenului şi la creşterea celei a bioxidului de carbon. Pentru evaluarea calitativă şi cantitativă a neomogenităţilor locale ale distribuţiei ventilaţiei şi perfuziei s-a utilizat scintigrafia pulmonară.

Tehnica propusă de West (citat de W. Hope ş.a., 1983) se bazează pe măsurarea în diferite zone ale toracelui a cantităţii de bioxid de carbon radioactiv inspirat.

In schimb tehnica propusă de Thews şi Vogel se bazează pe inspirarea a trei gaze radioactive cu diferite proprietăţi de difuzie: CO_2 difuzează bine, O_2 moderat iar Ar foarte greu. Spectrometria de masă a fost utilizată pentru determinarea concentraţiilor acestor gaze. Din valorile diferite ale constantei de timp de eliminare a bioxidului de carbon, oxigenului şi argonului se obţin informaţii despre distribuţia funcţională a ventilaţiei alveolare, perfuziei pulmonare şi capacităţii de difuzie a oxigenului.

Din punct de vedere funcţional s-au identificat două compartimente, fiecare formate dintr-un număr mare de alveole răspândite în ambii plămâni: un compartiment bine ventilat

($\dot{V}_{A1}$ =4 litri / min) şi altul slab ventilat ($\dot{V}_{A2}$=1,6 litri / min) dar ambele cu valori aproape egale ale perfuziei (d_{v1}=2,7 litri / min, respectiv d_{v2}=2,5 litri / min) şi capacităţii de difuzie a oxigenului c_{d1}=100 ml / min kPa şi respectiv c_{d2}=135 ml / min kPa. Rezultă imediat că rapoartele ventilaţie - perfuzie nu sunt aceleaşi în cele două compartimente.

14.2 Modelul matematic al schimburilor de gaze

Acest model, propus de Kroch, este denumit şi modelul cilindrului lui Kroch (Figura 91), deoarece se referă la analiza distribuţiei spaţiale a presiunii parţiale a oxigenului într-un ţesut ipotetic de formă cilindrică, alimentat de un vas de sânge capilar de-a lungul axei cilindrului.

Ecuaţia diferenţială adecvată este de forma:

$$\frac{\partial^2 P}{\partial r^2} + \frac{1}{r}\frac{\partial P}{\partial r} + \frac{\partial^2 P}{\partial z^2} = \frac{A}{K} \qquad (167)$$

unde **P** este presiunea, **r** şi **z** sunt coordonatele axială şi radială, **K** este constanta lui Kroch iar **A** este rata de consumare, care

apare în cea de-a doua ecuaţie a lui Fick, descriind difuzia, şi anume:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D\nabla^2 C - A \tag{168}$$

unde **C** este concentraţia iar **D** este coeficientul de difuzie. La echilibru variaţia în timp a concentraţiei este nulă astfel că rata de consumare rămâne egală cu produsul dintre laplaceianul concentraţiei (derivata de ordinul doi în raport cu coordonatele spaţiale) şi coeficientul de difuzie:

$$A = D\nabla^2 C \tag{169}$$

Dacă se are în vedere că difuzia axială a oxigenului este neglijabilă faţă de cea radială:

$$\frac{\partial P}{\partial z} \rightarrow 0 \tag{170}$$

Atunci ecuaţia diferenţială propusă mai sus se simplifică:

$$\frac{\partial^2 P}{\partial r^2} + \frac{1}{r}\frac{\partial P}{\partial r} = \frac{A}{K} \tag{171}$$

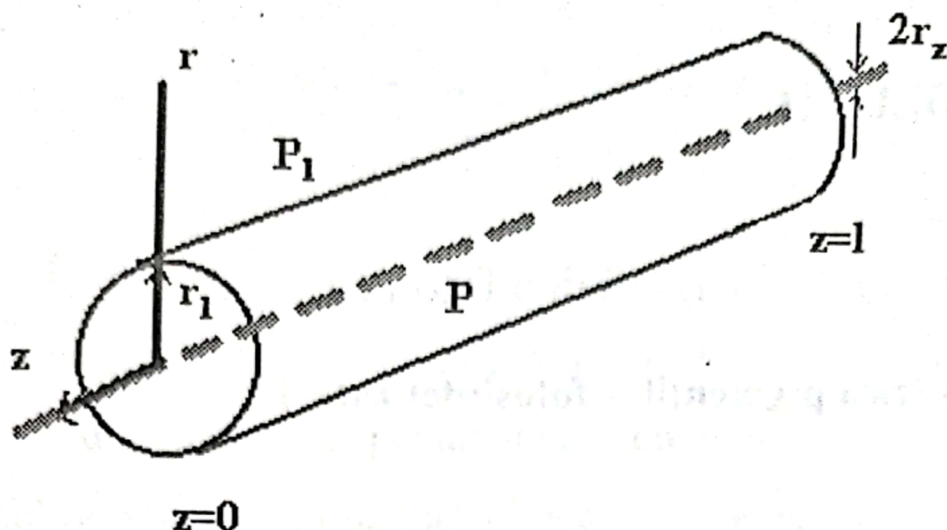


Figura 91. - Cilindrul lui Kroch modelează presiunea parţială a oxigenului într-un cilindru de ţesut alimentat cu sânge de la un capilar central, axial

Condițiile la limită sunt de forma:

$$\frac{\partial P}{\partial r}=0 \text{ pentru } r=r_z \text{ şi } \frac{\partial P}{\partial z}=0 \text{ pentru } z=0, z=l \qquad (172)$$

Se introduce noţiunea de valoare critică a presiunii (şi corespunzător, valoarea critică a razei cilindrului) pentru a marca existenţa unei valori maxime a vitezelor reacţiilor enzimatice condiţionate de oxigen:

$$P=P_{cr} \text{ şi } \frac{dP}{dr}=0 \text{ pentru } r=r_{cr} \qquad (174)$$

Ecuaţia pentru calcularea razei critice de alimentare cu oxigen:

$$r_{cr}^2\left(2\ln\frac{r_{cr}}{r_1}-1\right)=\frac{4K}{A}(P_1-P_{cr})-r_1^2 \qquad (175)$$

Astfel, pe baza acestui model se poate determina distanţa radială pe care alimentarea cu oxigen este suficientă pentru buna desfăşurare a reacţiilor enzimatice şi, implicit, delimitarea zonei insuficient alimentate cu oxigen.

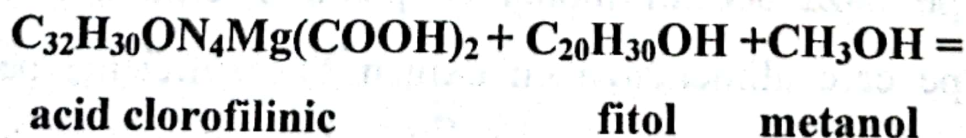
CAPITOLUL 15

Biofizica fotonică

15.1.Biofizica pigmenţilor fotosintetizatori

Din membranele cloroplastelor ţesuturilor vegetale ale plantelor, s-au extras mai multe tipuri de pigmenţi fotosintetizatori dintre care cei mai răspândiţi sunt: *clorofila **a**, clorofila **b**, carotenul **β*** şi *carotenul **α*** Mai pot fi întâlniţi: *xantofila, bacterioclorofila* (la bacteriile sulfuroase verzi şi purpurii) *fucoxantina* (în algele brune), *ficoeritrina* şi *ficocianina* (pigmenţi ficobilieni, puţin reprezentaţi în cloroplastele frunzelor verzi ale plantelor superioare, dar frecvent întâlniţi în algele roşii şi respectiv albastre).

*Clorofila **a*** este rezultatul esterificării acidului clorofilinic (clorofilina) cu alcoolul metilic (metanol) şi cu un alt alcool, cu molecula mai mare, fitolul:



$$C_{32}H_{30}ON_4Mg(COOH)_2 + C_{20}H_{30}OH + CH_3OH =$$

acid clorofilinic **fitol** **metanol**



$$C_{32}H_{30}ON_4Mg(COO)_2C_{21}H_{42} + 2\ H_2O$$

Clorofila **apa**

În formula structurală se disting patru inele pirolice (heterocicli pentanonici cu câte 4 atomi de carbon şi unul de azot) şi un homociclu pentanonic - cu 5 atomi de carbon. Atomul de magneziu din centrul acestei structuri este legat de cele patru inele pirolice prin patru legături de coordinaţie (Figura 92).

La *clorofila **b***, în locul unei grupări metilice (CH_3), care este ataşată unuia din inelele pirolice de la clorofila **a**, apare o grupare a aldehidei formice (C=OH). Această aparent minoră deosebire structurală, face ca în spectrele electronice să apară deplasări semnificative ale maximelor benzilor de absorbţie şi a celor de fluorescenţă din vizibil.

Din cauza numărului mare de atomi de carbon şi de hidrogen fitolul conferă clorofilei proprietăţi hidrofobe şi lipofile (de insolubilitate în apă şi de solubilitate în acizi graşi).

Clorofila **a** se poate ataşa la multe molecule proteice din membrana cloroplastelor, ceea ce îi conferă o mai mare stabilitate la lumină deoarece, în stare izolată este repede fotooxidată până la feofitina **a**.

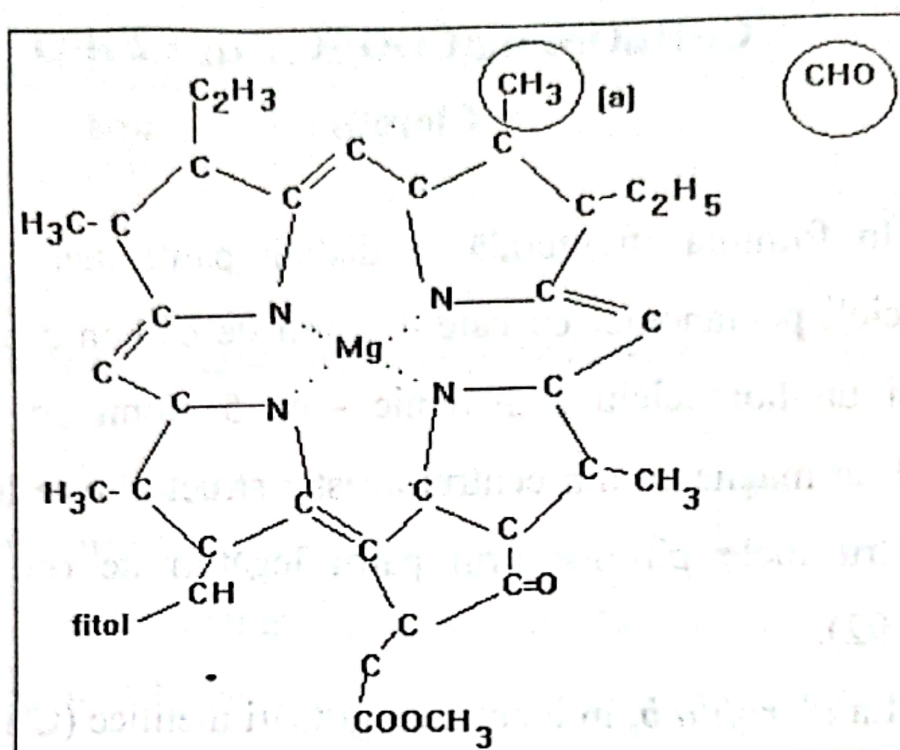


Figura 92 .- Structura clorofilelor *a* şi *b*

Cele două tipuri de clorofile (**a** şi **b**) nu se transformă una în alta, prin oxidoreduceri.

15.2. Spectrele pigmenţilor fotosintetizatori în domeniul vizibil

Clorofilele absorb şi pot emite fluorescent la ambele capete ale domeniului vizibil al radiaţiilor electromagnetice adică şi în subdomeniul roşu şi în subdomeniul albastru (ceea

ce explică şi culoarea lor verde gălbuie, corespunzătoare subdomeniului spectral care este emis de aceste molecule).

După cum s-a arătat mai sus, mediul de dispersie influenţează poziţia maximelor benzilor de absorbţie, de aceea, descrierea spectrelor impune şi precizarea solventului în care a fost preparată proba de clorofilă, după extragerea sa din planta studiată.

Maximele de absorbţie în eter etilic sunt la 430 nm şi respectiv 662 nm pentru clorofila **a,** iar pentru clorofila **b,** aceste maxime sunt la lungimile de undă de 453 nm şi respectiv 642 nm (Figura 93).

Nivelele energetice între care se realizează tranziţiile corespunzătoare acestor maxime de absorbţie, sunt nivelul fundamental, S_0 şi nivelele excitate S_1^a şi S_1^b (S de la cercetătorul Soret, care a cercetat aceste absorbţii).

Nivelul fundamental este un nivel electronic de tip singlet, adică are multiplicitatea de spin egală cu 1 (cei doi electroni π moleculari implicaţi în tranziţiile electronice având spini antiparaleli), la fel cu cele două nivele excitate S_1^a şi S_1^b, (Hochkoeppler A. and all.,1995).

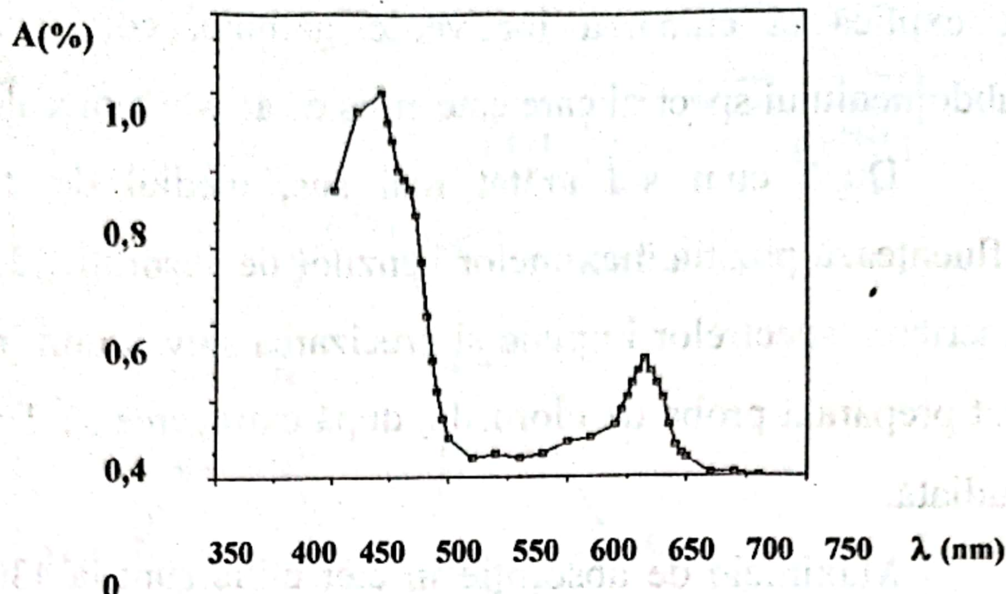


Figura 93. - Spectrul de absorbţie al clorofilei *a* obţinut în acetonă prin măsurători punctuale (M. Ştirban, 1981)

Nivelul fundamental este un nivel electronic de tip singlet, adică are multiplicitatea de spin egală cu 1 (cei doi electroni π moleculari implicaţi în tranziţiile electronice având spini antiparaleli), la fel cu cele două nivele excitate S_1^a şi S_1^b

$$\begin{aligned} \chi &= 2S + 1 = 1 \\ S &= S_1 + S_2 \\ S_1 &= -S_2 = \frac{1}{2} \end{aligned} \qquad (176)$$

în timp ce nivelul **T** este un nivel electronic de tip triplet, adică are multiplicitatea de spin egală cu 3 (cei doi electroni au spini paraleli).

$$\chi = 2S + 1 = 3$$
$$S = S_1 + S_2 \qquad (177)$$
$$S_1 = S_2 = \frac{1}{2}$$

Banda de absorbţie din regiunea roşie a spectrului corespunde tranziţiei S_0 - S_1^a iar banda de absorbţie din regiunea albastră a spectrului corespunde tranziţiei S_0 - S_1^b (Figura 94).

Absorbţiile altor pigmenţi sunt redate în tabel (Tabelul 11).

Tabelul 11. Maximele de absorbţie din vizibil pentru diferiţi pigmenţi din lumea vie (S. Neamţu şi V. Tamaş 1986)

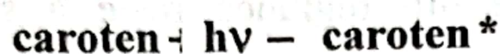
Pigmentul	Maximul de absorbţie (nm)		
Carotenul β	452	482	
Carotenul α	446	476	
Xantofila	450	481	
Fucoxantina	452	470	
Ficoeritrina	457	566	
Ficocianina	616	-	
Bacterioclorofila	366	605	770

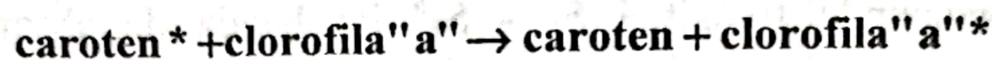
Ca urmare a tranziţiei S_1^a - S_0 se obţine banda de emisie (*fluorescenţă*) din regiunea roşie a spectrului vizibil, iar prin tranziţia S_1^b - S_0 banda de fluorescenţă din regiunea verde-albastru. Acest tranziţii sunt de tip radiativ (Figurile 94 şi 95).

Numai clorofila **a** poate intermedia transformarea energiei electromagnetice în energie chimică; ceilalţi pigmenţi

susţin procesul fotosintetic prin transmiterea energiei electromagnetice absorbite, către clorofila **a**.

Astfel, rolul pigmenţilor carotenoizi poate fi descris sintetic astfel:


$$\text{caroten} + h\nu \rightarrow \text{caroten}^*$$


$$\text{caroten}^* + \text{clorofila"a"} \rightarrow \text{caroten} + \text{clorofila"a"}^*$$


$$\text{clorofila"a"}^* \rightarrow \text{clorofila"a"} + \text{energie chimica}$$

unde indicele * desemnează starea energetică excitată a moleculelor.

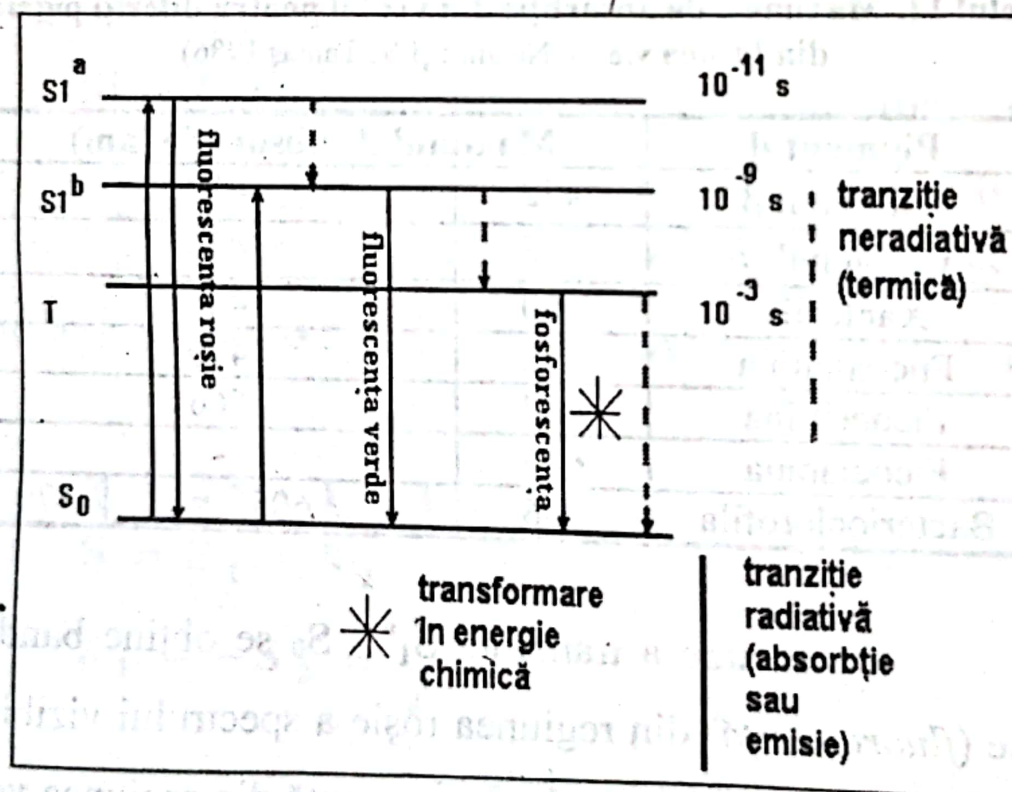


Figura 94. - Schema nivelelor şi tranziţiilor electronice în molecula de clorofilă *a* (S. Neamţu şi V. Tamaş 1986)

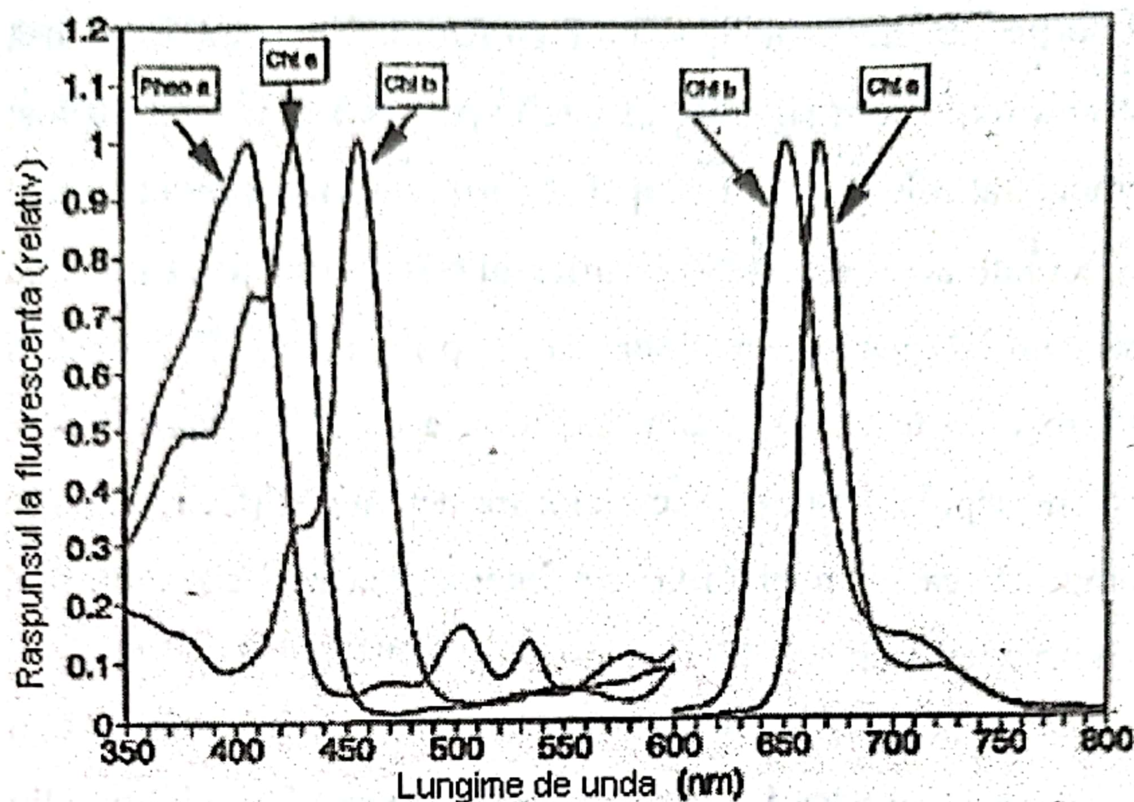


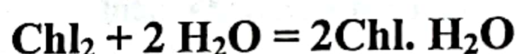
Figura 95. - Spectrele de fluorescență ale clorofilelor *a, b* şi al feofitinei *a* (M. Ştirban 1981)

Asociaţiile moleculare ale clorofilei în mediu apos se bazează pe legături de hidrogen care stau la baza apariţiei unor dimeri hidrataţi de clorofilă **a**.

15.3. Interacţiunea clorofilei cu apa

S-a arătat că apa este într-o relaţie specială cu clorofila. Unele din primele rezultate experimentale obţinute pe un amestec de clorofilă **a** şi clorofilă **b** extrase din plante demonstrează că clorofilele şi alchilclorofilidele conţin şi apă în

proporţie de 0,5 mol apă/ mol clorofilă. Raportul este însă variabil după cum se arată în alte experimente. Ulterior a fost demonstrat rolul esenţial al apei în formarea clorofilei cristaline şi deci interacţiunile apă - clorofilă au o semnificaţie structurală specială. Rappaport a demonstrat prin studii în spectrul infraroşu că în cazul în care clorofila **a** este dizolvată într-un solvent nepolar, cum este tetraclorura de carbon (CCl_4), apa se comportă ca o nucleofilă ce interacţionează cu clorofila, conform ecuaţiei:



$$\mathbf{Chl_2 + 2\,H_2O = 2Chl.\,H_2O}$$

Studii sistematice asupra *afinităţii pentru apă a clorofilei* s-au efectuat prin utilizarea clorofilei deshidratate, obţinută prin diferite tehnici de uscare (vid, curent de azot, la diferite presiuni, temperaturi, prin solviri şi evaporări succesive în şi din mai mulţi solvenţi anhidri, la care se adaugă treptat cantităţi foarte mici de apă).

• Absorbţia în spectrul infraroşu este unul din procedeele capabile să dea informaţii cantitative limitate despre raportul molar apă / clorofilă. Astfel banda de absorbţie în spectrul infraroşu a legăturii O-H din apă, de la 3700 cm^{-1} este de intensitate diferită de zero pentru un conţinut de apă mai mare

ca 10^{-5} mol în soluţia de clorofilă studiată (la o grosime a cuvei de spectrofotometrie de 10 mm) sau pentru un conţinut de apă de 10^{-3} mol dacă grosimea cuvei este de 10^{-1} mm.

Prezenţa semnificativă a apei (peste 100:1 moli clorofilă/ moli apă, deci 10^{-2} moli apă la un mol de clorofilă) se manifestă în spectrele de vibraţie *prin apariţia unei benzi măsurabile (cu intensitate diferită de zero) la circa 1638 cm*$^{-1}$, simultan *cu scăderea spre zero a intensităţii benzii de la 1695 cm*$^{-1}$, ceea ce *înseamnă apariţia legăturii de hidrogen dintre apă şi clorofilă la nivelul legăturii carbonil C=O,* legătură ce vibrează la 1638 cm^{-1}; în lipsa apei ar fi apărut banda de la 1695 cm^{-1}.

Clorofila **b** este mult mai greu de deshidratat decât clorofila **a** ,ceea ce indică o interacţiune mai puternică între apă şi această moleculă de clorofilă. Starea stabilă a hidratului de clorofila **b** poate fi un trimer de clorofilă **b** monohidratată sau dihidratată.

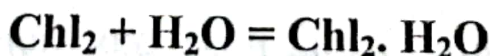
Clorofila **a** hidratată, aşa cum pare să fie cea obţinută prin procedeele standard, care nu limitează contactul cu aerul, deci şi cu apa din aer, este de asemenea monohidratată. În spectrele din domeniul vizibil, lipsa maximelor de la 740 - 745 nm în cazul clorofilei **a** solvită în hidrocarburi alifatice, înseamnă lipsa apei sau prezenţa unui număr foarte mic de

monomeri de clorofilă hidratată ($Chla.H_2O$). Această bandă din domeniul vizibil, este o expresie a legării unei molecule de apă la atomul de magneziu al moleculei de clorofilă.

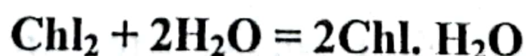
Moleculele de clorofilă cu atomul de magneziu liber absorb la 665-673 nm. Când această bandă nu este prezentă, existenţa celei de la 740-745 nm, semnifică hidratarea maximă a moleculele de clorofilă (raportul clorofilă : apă este de 1:1). În acest caz se obţine şi o absorbţie intensă la 1638 cm^{-1} dacă se foloseşte ca solvent, tetraclorura de carbon.

Apa, prezentă printre moleculele de clorofilă dispersate într-un solvent nepolar (ex.: CCl_4), se poate lega atât la atomul de magneziu (cu un număr de coordinaţie mai mare ca patru) cât şi la gruparea carbonil, prin legătura intermoleculară de hidrogen.

Existenţa apei legată la carbonilul din molecula de clorofilă prin legătură de hidrogen este evidenţiată de absorbţia de la 3710 cm^{-1}, în timp ce prezenţa apei în stare monomerică liberă, prin absorbţia de la 3615 cm^{-1}. Principalele două situaţii de echilibru posibil sunt:



$$Chl_2 + H_2O = Chl_2 . H_2O$$



$$Chl_2 + 2H_2O = 2Chl . H_2O$$

În soluţie, pot exista dimeri de clorofilă nehidrataţi, realizaţi prin legături la nivelul atomului de magneziu dintr-o moleculă şi al grupării carbonil din alta.

Dimerul de clorofilă vibrează la 3665 cm^{-1}, vibraţie ce poate să coincidă şi cu vibraţia legăturii O-H din monomerul de clorofilă prin legarea apei la atomul de magneziu (Mg...O(H)O) şi cu dimerul hidratat al clorofilei.

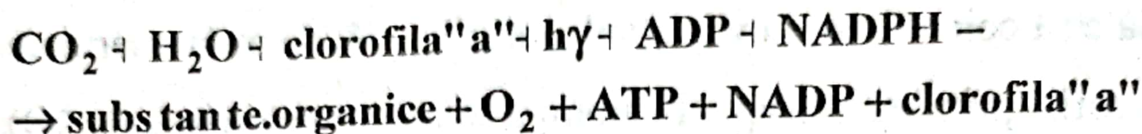
15.4. Fotosinteza

Fotosinteza, fenomenul complex prin care energia solară este convertită în energia chimică necesară sintezei de substanţe anorganice, în ţesuturile plantelor verzi, autotrofe, se derulează numai datorită existenţei clorofilelor din membranele cloroplastelor - organite citoplasmatice specifice celulei vegetale.

Rolul clorofilei **a** este de catalizator al lanţului de reacţii oxido-reducătoare prin care, pornind de la substanţe anorganice, ca apa şi bioxidul de carbon, se sintetizează compuşi organici precum glucidele, lipidele, aminoacizii, proteinele, etc.

Un mod de redare prescurtată a transformărilor complexe din cadrul fotosintezei trebuie să ia în considerare şi

rolul compuşilor macroergici din celulă (ATP - acid adenozintrifosforic) şi al transportorilor de electroni (NADP – nicotinamiddinucleotidfosfatul):



$$CO_2 + H_2O + clorofila''a'' + h\gamma + ADP + NADPH \rightarrow substante.organice + O_2 + ATP + NADP + clorofila''a''$$

Reacţiile condiţionate de prezenţa luminii au fost denumite *reacţii de lumină*, în timp ce un grup important de alte reacţii, consecutive celor iniţiale, se desfăşoară în lipsa luminii, denumite *reacţii de întuneric.*

Reacţiile de lumină sunt procesele fotosintetice de transport de electroni, declanşate de absorbţia luminii în moleculele de clorofilă din primul sistem fotosintetic celular (Figura 96) (bazat pe molecule de clorofilă **a** de tip I, cu un maxim de absorbţie la 700 nm). Patru astfel de molecule se energizează la nivelul electronilor **π** din învelişul electronic, aceştia părăsind clorofila care însă îşi recuperează pierderile, de la două molecule de apă ce suferă procesul de fotoliză.

Prin această reacţie un număr de patru atomi de hidrogen (şi patru electroni) sunt îndepărtaţi din moleculele de apă cu eliberarea consecutivă de oxigen.

Un al doilea centru fotosintetic (conţinând o formă de clorofilă **a** care are o absorbţie maximă la 680 nm) efectuează o a doua energizare a electronilor, o parte din energia aceasta fiind înmagazinată în NADP, care trece din forma oxidată, $NADP^+$, la forma redusă, NADPH.

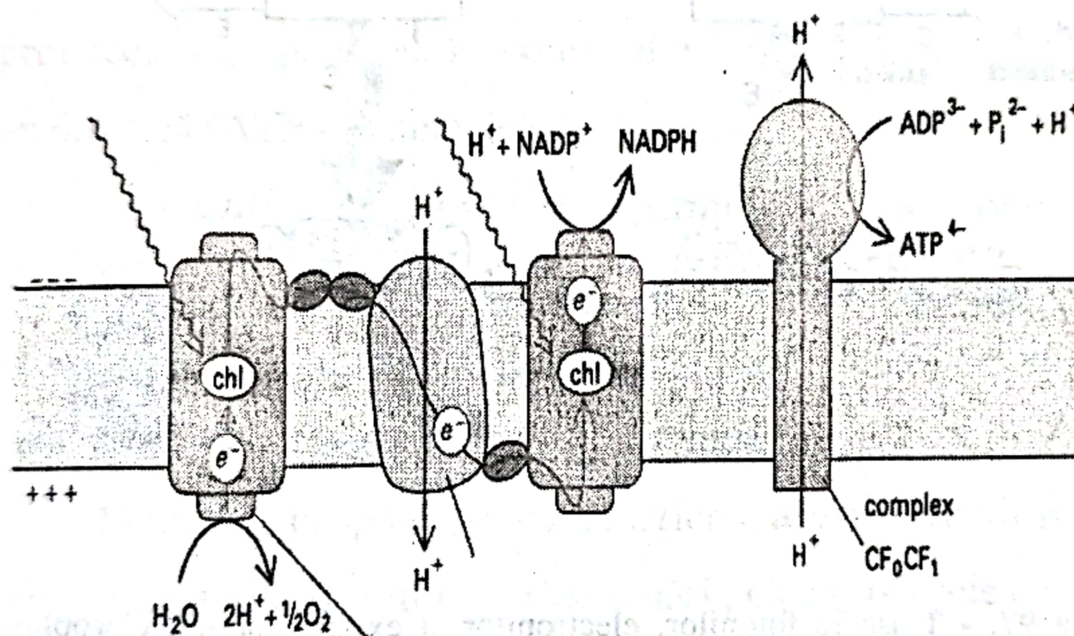


Figura 96. - Transformările moleculelor de apă, NADP şi ADP în membrana cloroplastelor. Acumularea de energie în moleculele de ATP se efectuează la nivelul complexului CF_0CF_1 foarte asemănător cu ATP - sintetază mitocondrială (J. Darnell şi col. 1990)

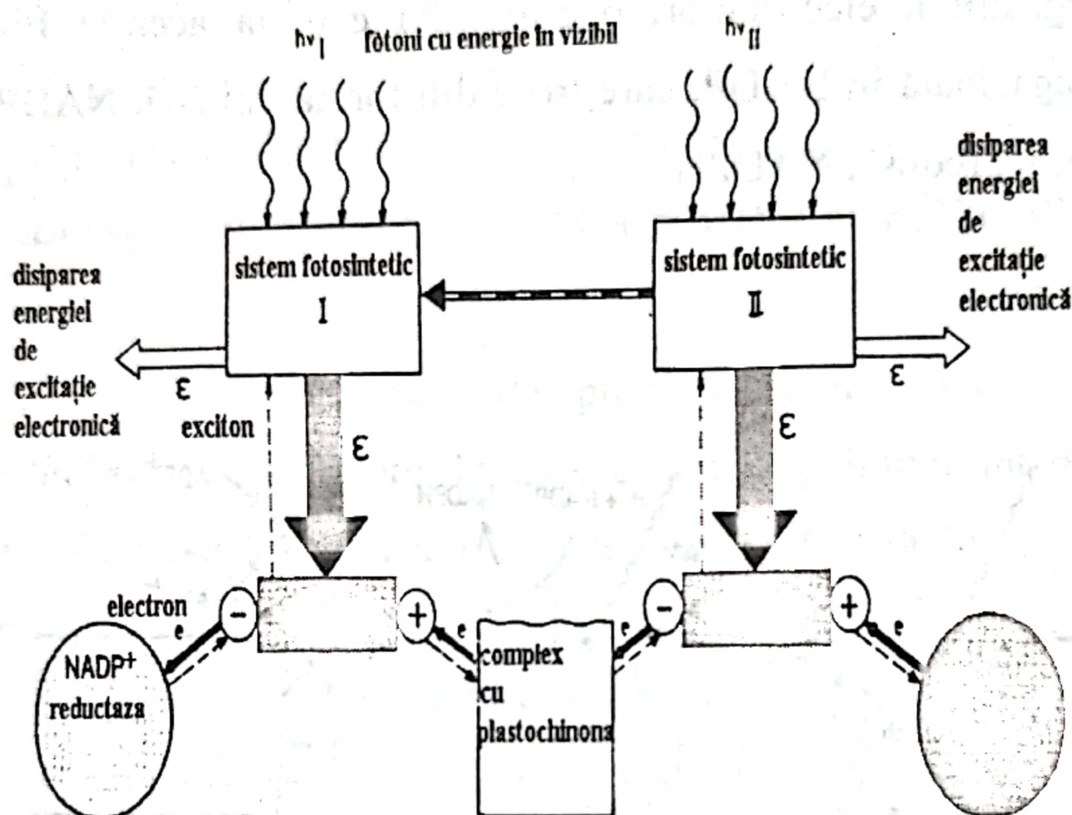


Figura 97. - Traseele fotonilor, electronilor şi excitonilor din cloroplaste corespunzători energiei radiante absorbite, energiei din procesele de oxido-reducere şi energiei de excitaţie electronică disipată (după W. Hope şi col. 1983.)

Electronii încărcaţi cu energia absorbită de clorofilă se dezenergizează de-a lungul unui şir de transformări oxido-reducătoare ale unui lanţ de compuşi ce formează lanţul respirator (o parte din energia cedată de ei fiind stocată în

molecula de ATP formată prin fosforilarea ADP), iar protonii sunt pompaţi în interiorul cloroplastului (Figurile 96 şi 97).

Procesele sunt foarte mult asemănătoare cu reacţiile oxido-reducătore specifice membranei interne a mitocondriale.

Mecanismul pompării fotonilor la nivelul complexelor proteice CF_0CF_1 se desfăşoară concomitent cu sinteza ATP-ului (Figura 98). Pompele de fotoni sunt agregate proteice, cu presupusă constituţie tripartită şi activitate enzimatică (ATP - sintetazică).

Reacţiile de întuneric permit sinteza compuşilor organici (Figura 99) pe baza carbonului din bioxidul de carbon şi a energiei înmagazinate de celulă (în moleculele de ATP) în decursul etapelor anterioare ale procesului.

Schemele propuse pentru descrierea acestor reacţii sunt încă susceptibile de multe perfecţionări , căci procesele ce se petrec în intimitatea celulei nu pot fi în totalitate înţelese din măsurători *in vitro* sau din determinări indirecte.

Importanţa covârşitoare pe care fotosinteza o prezintă atât pentru regnul vegetal, cât şi pentru cel animal, aproape în totalitate dependent de primul, face ca studierea sa în continuare, să preocupe intens lumea ştiinţifică.

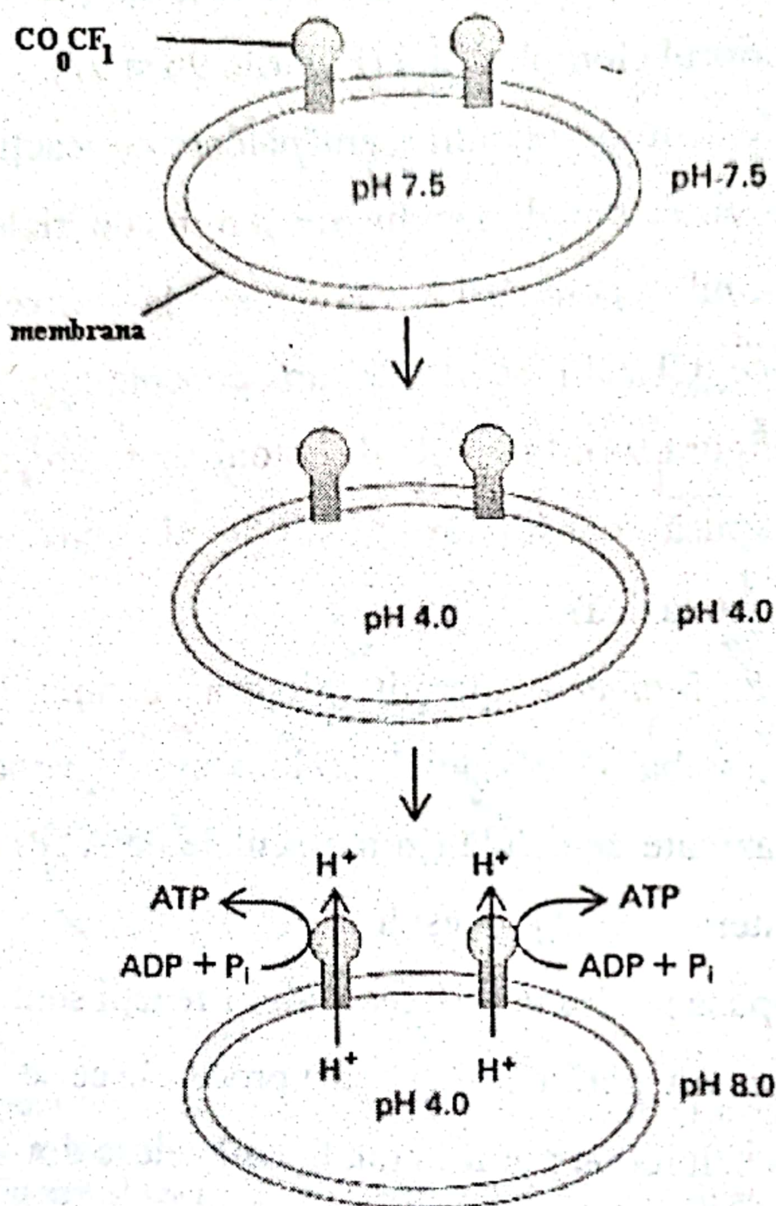


Figura 98. - Experimentele cu suspensii de vezicule conţinând cloroplaste au arătat că un gradient de pH impus artificial (scăderea de la pH - 7,5 neutru, la pH - 4 acid) poate favoriza sinteza ATP-ului din ADP şi fosfat (J. Darnell şi col. 1990)

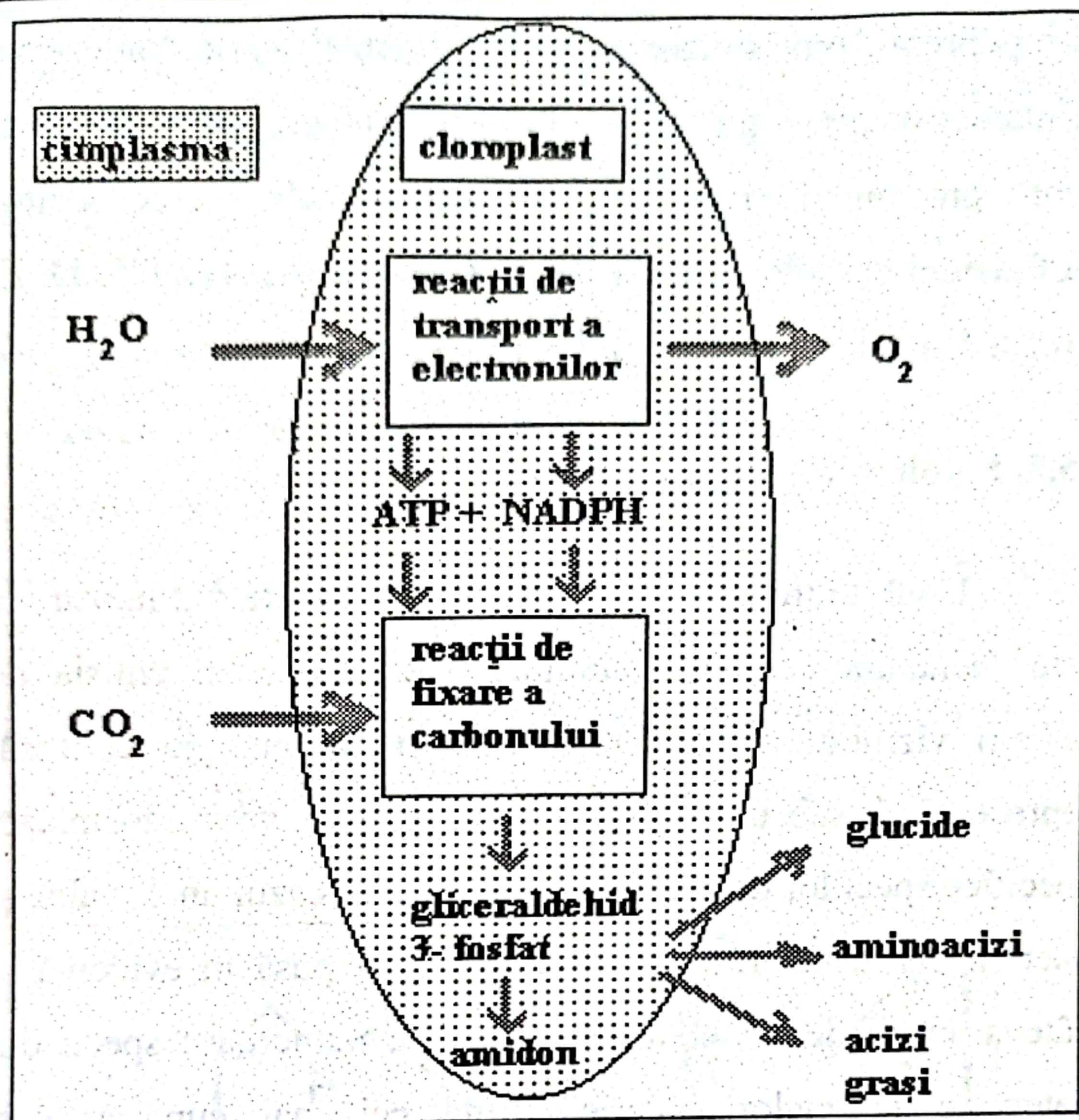


Figura 99. - Cele două grupe importante de reacţii din cadrul fotosintezei (după Alberts şi col. 1989)

Reproducerea în laborator a fotolizei apei ar putea, de exemplu, să asigure un combustibil ideal – hidrogenul - şi să producă concomitent mari cantităţi de oxigen, ceea ce ar rezolva una din marile probleme contemporane ale omenirii.

Studii preliminare asupra influenţei unor tratamente magnetice asupra pigmenţilor clorofilieni au constituit subiectul unor preocupări relativ mai recente ale cercetătorilor biofizicieni şi biologi ieşeni (D. E. Creangă şi col. 1995; D. E. Creangă şi col. 1996; A. Pavel şi col. 1999).

15.5. Fotoluminiscenţa

Unul dintre procesele cele mai fascinante din lumea vie este *bioluminescenţa*. Bioluminescenţa constă în emisia de radiaţii vizibile pe baza unui consum de energie chimică, reprezentând, sub unele aspecte, un proces invers fotosintezei specifice speciilor de plante superioare şi în cazul unelor alge şi bacterii autotrofe. Bioluminescenţa a fost pusă în evidenţă la câteva specii de vertebrate (peşti) şi la numeroase specii din categoria insectelor (licuricii fiind cei mai cunoscuţi) şi moluştelor precum şi la diverse alge, bacterii, protozoare.

La animale, bioluminescenţa este comandată de sistemul nervos ale cărui terminaţii inervează organul bioluminescent. Influxul nervos declanşează eliberarea de acetilcolină urmată de activarea celulelor generatoare de energie electromagnetică în vizibil. Rolul bioluminescenţei diferă de la o specie la alta, el reprezentând un semnal cu

semnificaţie sexuală la licurici, un semnal de vânătoare la peştii luminescenţi, un ecran de protecţie optică la unele specii de moluşte.

Denumirea generică pentru substanţa bioluminescentă este *luciferina,* fie că este vorba de o fluorescenţă - adică o emisie care se produce imediat după acţiunea stimulului, fie că este vorba de o fosforescenţă - adică o emisie care succede la un interval de timp mai mare după încetarea acţiunii stimulului.

La diferite specii structura acestei substanţe diferă şi ea. Formula chimică a luciferinei (Figura 100) din ţesutul extern al abdomenului licuriciului este următoarea:

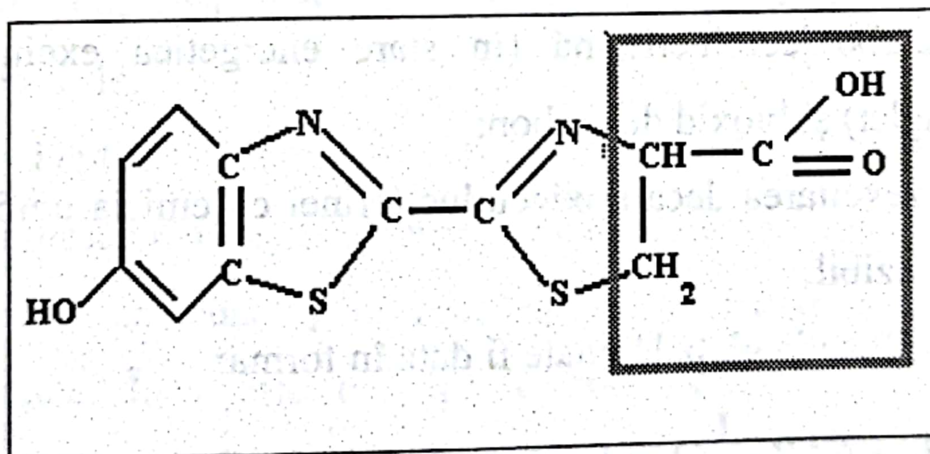


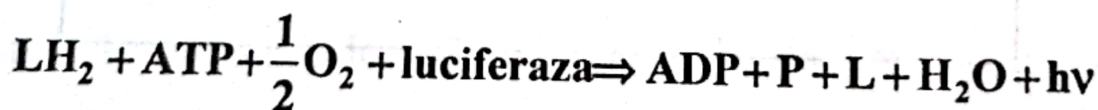
Figura 100. - Structura luciferinei de la licurici. Partea marcată participă efectiv la transformările energetice

Procesele chimice pe care le suferă luciferina, sunt legate de oxido - reducerile din organismul respectiv prin care

oxigenul este implicat în mod nemijlocit în bioluminescență. Enzima care controlează transformările luciferinei este denumită generic *luciferază*. Etapele transformării luciferinei pot fi prezentate rezumativ astfel:

- Activarea luciferinei prin interacțiune cu luciferaza în prezența ATP (acid adenozintrifosforic care înmagazinează energie metabolică) şi a ionilor bivalenți de magneziu; se formează complexul luciferină - AMP (acid adenozin monofosforic);
- Oxidarea complexului luciferină - AMP cu formarea unui endoperoxid de luciferină;
- Scindarea endoperoxidului de luciferină în decarboxicetoluciferină (în stare energetică excitată de singlet) şi bioxid de carbon;
- Dezexcitarea decarboxicetoluciferinei cu emisia unui foton în vizibil.

Reacția globală poate fi dată în forma:



$$LH_2 + ATP + \frac{1}{2}O_2 + \text{luciferaza} \Rightarrow ADP + P + L + H_2O + h\nu$$

unde: LH_2 este luciferina în stare redusă, **L** este luciferina în stare oxidată, **P** este o grupare fosforică iar $h\nu$ este cuanta de energie emisă. Schema nivelelor energetice electronice şi a tranzițiilor dintre acestea poate fi prezentată ca în Figura 101.

Parametrii fizici ai bioluminescenţei vizează: compoziţia spectrală, intensitatea emisiei, randamentul emisiei.

Distribuţia spectrală a emisiilor bioluminescente variază de la o specie la alta, în cazul licuricilor fiind o emisie în domeniul galben-verzui, în cazul unor specii de peşti şi moluşte fiind o emisie în domeniul roşu iar la unele microorganisme de tipul fungilor fiind o emisie în verde.

Intensitatea emisiei unei singure bacterii din specia *Bacillus phosphorescens* este evaluată la $1{,}9 \times 10^{-14}$ cd (*candelă*, unitate de măsură a intensităţii luminii în sistemul internaţional) iar în cazul unor femele de *Lampyris noctiluca* (licurici) la $1{,}6 \times 10^{-14}$ cd, ceea ce este suficient pentru impresionarea hârtiei fotosensibile.

Pentru definirea *randamentului chimic* al bioluminescenţei s-a propus raportarea energiei emise (exprimată în cuante) la numărul de molecule de oxigen consumate. În aceste condiţii, o bacterie emite în fiecare secundă o cuantă de energie în vizibil şi consumă 33 molecule de oxigen în timp ce pentru dezexcitarea fiecărei molecule de luciferină în cazul licuriciului este necesară o singură moleculă de oxigen.

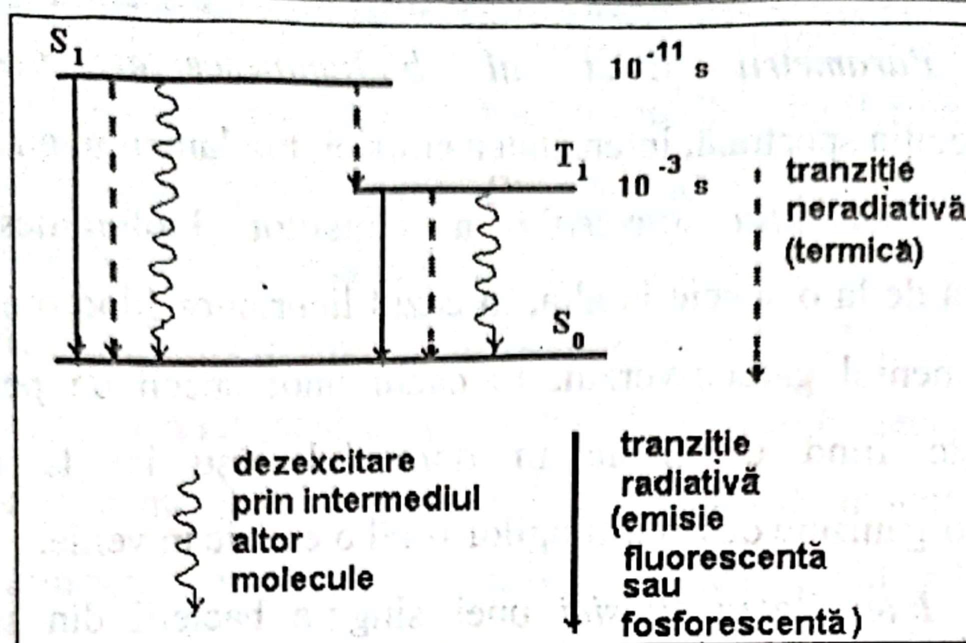


Figura 101. - Tranziţiile energetice între nivelele electronice de singlet (S_1-S_0) şi triplet (T_1-S_0) din molecula de luciferină (după V. Gheorghiu şi A. Popescu 1990).

Multe cercetări au vizat evidenţierea luminescenţei la proteine şi aminoacizi, (Szent - Gyorgyi, Debye şi Edwards, Konev, şi col., 1972), acest fenomen fiind confirmat în domeniul 450-300 nm şi pH apropiat de cel neutru, pentru aminoacizii aromatici (tirozina, triptofanul, fenilalanina) dar şi pentru cei alifatici sau sulfuraţi. Ca şi soluţiile de aminoacizi îngheţate la temperaturi foarte scăzute (temperatura având o influenţă semnificativă asupra populaţiilor nivelelor electronice moleculare), şi proteinele care conţin resturi ale acestor aminoacizi au prezentat fosforescenţă ca urmare a excitării cu radiaţii electromagnetice din zona maximelor de absorbţie ale triptofanului şi tirozinei, în special. Acest tip de luminescenţă

este o *fotoluminescență*, fiind consecința excitării cu energie luminoasă.La bazele azotate ale acizilor nucleici fluorescența şi fosforescența (Tabelul 12) au fost evidențiate în domeniul 310-350 nm, pentru soluții înghețate la temperatura azotului lichid şi la valori extreme de pH: acid sau bazic.

Tabelul 12. Lungimile de undă la care bazele azotate prezintă maxime de fotoluminescență (după C. Nicolau şi Z. Simon, 1967)

Molecula	pH	Maxim de fluorescență (nm)	Maxim de fosforescență (nm)
Citozină	1 – aciditate maximă 7 – neutru 11- foarte bazic	315 312 340-365	 400
Timină	7 – neutru 11 – foarte bazic	316 320	 435
Uracil	7 – neutru 11 – foarte bazic	315 350	 410
Adenină	1 – aciditate maximă 7 – neutru 11 – foarte bazic	219, 303, 312, 325 284, 294, 307, 318	375, 398, 418 365, 384, 404, 425
Guanină	1 – aciditate maximă 7 – neutru 11 – foarte bazic	215 320 322	385, 405, 425 360, 380, 409, 417 408

În subcapitolul dedicat clorofilei se poate vedea că fluorescența și fosforescența sunt proprietăți fizice notabile ale acestui tip de molecule.

Prin utilizarea unor fotomultiplicatori de mare sensibilitate s-a evidențiat faptul că, mârea majoritate a țesuturilor vii prezintă emisii luminescente de foarte mică intensitate: semințele, rădăcinile, frunzele tuturor speciilor de plante, celulele creierului, ficatului, pielii la toate speciile de mamifere. Aceste emisii de foarte mică intensitate se presupun a fi legate de necesitatea eliminării unui excedent de energie care se cere eliberată imediat ce reacțiile metabolice furnizează mai multă energie decât este necesar pentru echilibrul energetic. Deci, această ipoteză consideră că bioluminescența, dacă nu are un rol indispensabil în adaptarea și reglarea organismului, atunci reprezintă o supapă de siguranță ceea ce se consideră, de asemenea, o funcție indispensabilă vieții.

15.6. Elemente de biofizica pigmenților fotosensibili

Rodopsina este denumirea generică pentru o clasă întreagă de pigmenți fotosensibili - molecule proteice de tipul cromoproteinelor care sunt alcătuite dintr-o parte proteică masivă - *opsina* și un cromofor - *retinalul*. Localizarea celulară

a acestor pigmenţi este la nivelul membranei celulare (Figura 102).

La vertebrate, celulele fotoreceptoare conţin nişte formaţiuni specializate în depozitarea rodopsinei şi anume discurile din segmentul extern al bastonaşelor sau conurilor (Figura 103).

Diferenţele dintre molecule de tipul rodopsinei constau atât în deosebiri structurale la nivelul opsinei, cât şi al cromoforului. Astfel, la celulele fotoreceptoare numite *bastonaşe,* rodopsina este caracterizată de o curbă de absorbţie

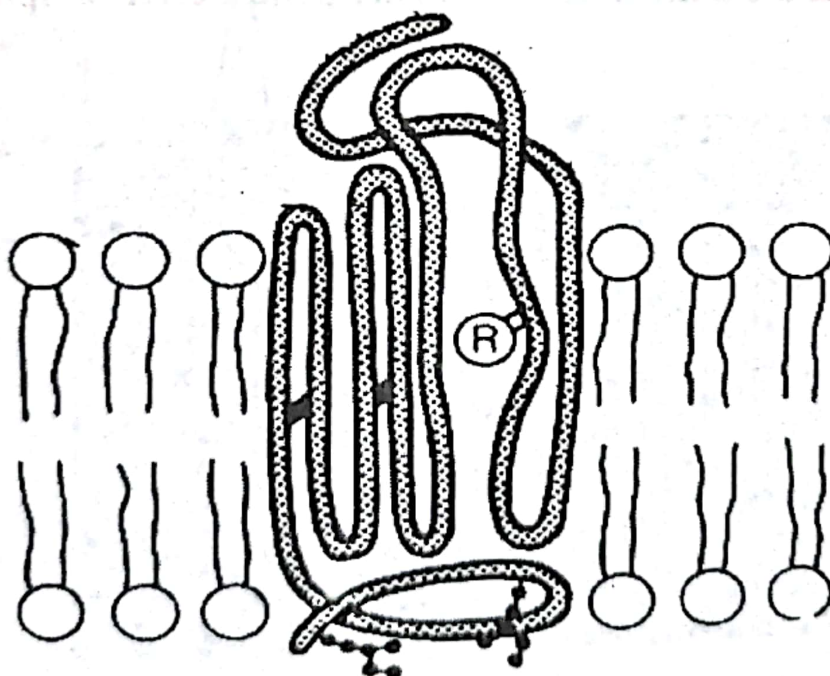


Figura 102. - Asamblarea rodopsinei în membrana discurilor din celulele fotoreceptoare ale vertebratelor (poziţia retinalului R - nu este suficient de bine precizată) (după W. Hope şi col. 1983)

ce diferă de cele ale rodopsinelor celuilat tip de fotoreceptori, *conurile* (trei tipuri principale de rodopsine). De asemenea, la nevertebratele cu sistem vizual foarte dezvoltat (insecte diurne numite diptere), se întâlnesc diferite tipuri de pigment fotosensibil, numit *xantopsină* (după numele precursorilor săi xantofilici).

În toate cazurile numai pigmentul rodopsinei absoarbe radiația luminoasă din vizibil şi chiar din ultraviolet la unele specii de nevertebrate (Figura 104) care suferă apoi o serie de modificări conformaţionale care se traduc în final în modificări de permeabilitate a membranei celulare pentru diferite tipuri de ioni mici.

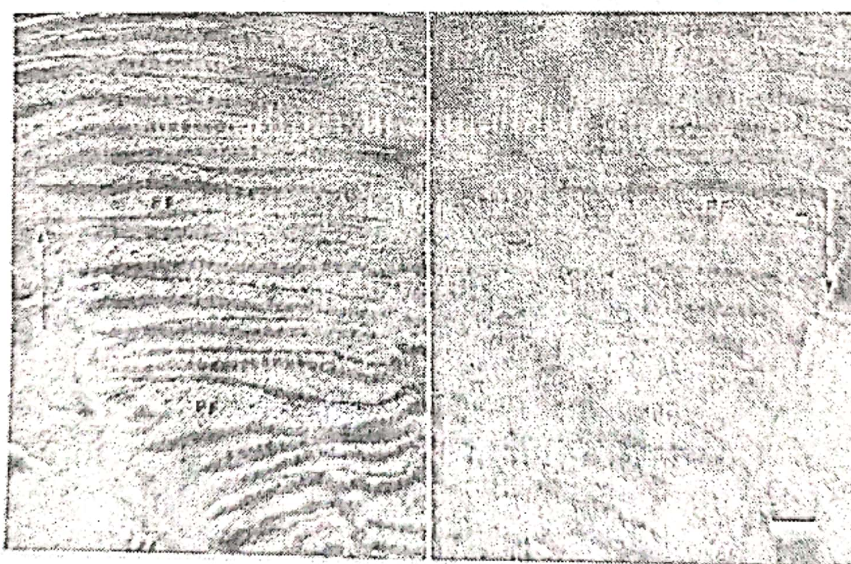


Figura 103. - Imagine obţinută la microscopul electronic relevând formaţiunile de natură membranoasă (discurile) din celulele fotoreceptoare ale vertebratelor (W. Hope şi col. 1983)

Principala modificare conformaţională este considerată cea de trecere a cromoforului de la forma *cis* la forma *trans* (Figura 105).

Într-un model al transformărilor chimice ale rodopsinei, elaborat de Hendrichs (Figura 106), după această etapă a efectului fotochimic urmează alte transformări care duc la lumirodopsină, metarodopsină şi în final la desprinderea transretinalului de partea proteică (ceea ce nu se întâmplă şi la xantopsina nevertebratelor).

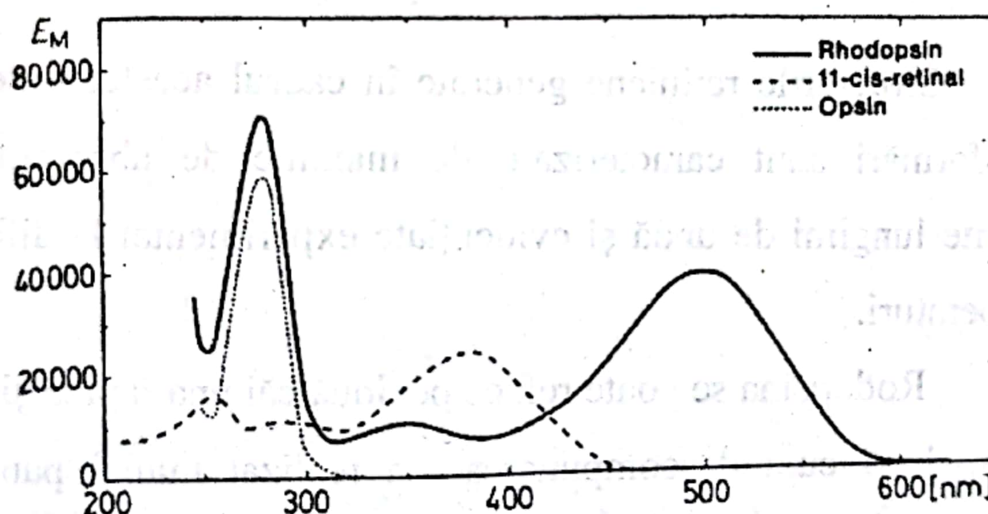


Figura 104. - Spectrele de absorbţie ale rodopsinei, 11-cis retinalului şi opsinei în domeniul de la 200 nm la 600 nm lungime de undă (modificat după W. Hope şi col.)

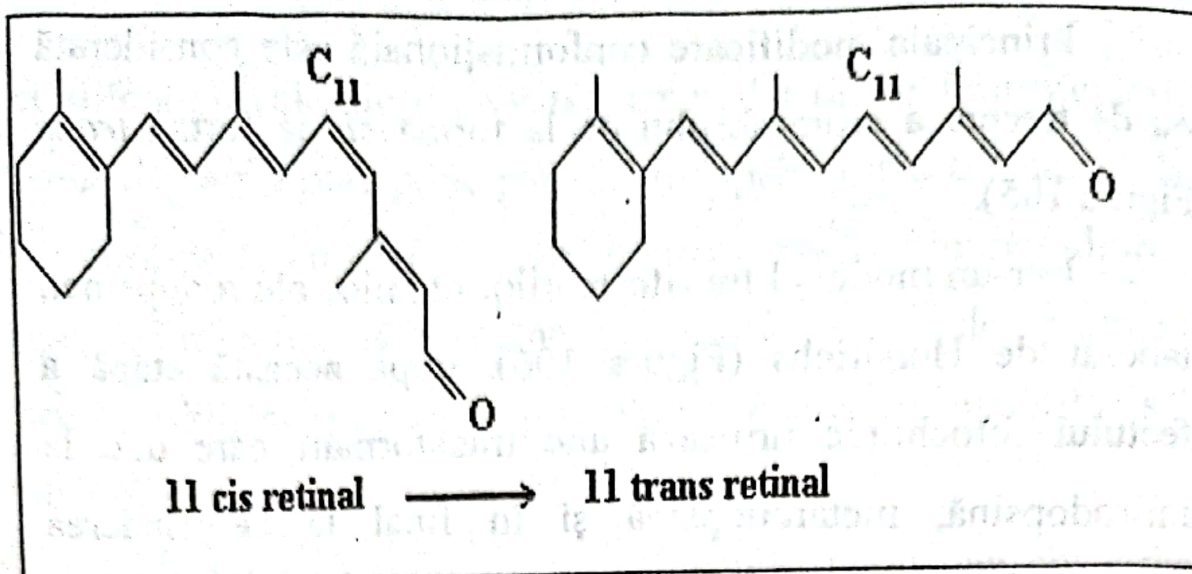


Figura 105. - Transformarea conformaţională a retinalului după absorbţia luminii (după F. Gremy şi J. Perrin 1975)

Structurile retiniene generate în cadrul acestei suite de transformări sunt caracterizate de maxime de absorbţie la diferite lungimi de undă şi evidenţiate experimental la diferite temperaturi.

Rodopsina se poate reface pe două căi una rapidă şi alta lentă, după cum descompunerea s-a realizat numai până la *retinal* sau până la *retinol* (vitamina A), ceea ce poate să explice diferenţa în viteza de adaptare de la obscuritate la iluminare a ochiului.

Pigmentul fotosensibil din bastonaşe (rodopsina denumită şi purpur retinian) are o curbă de absorbţie **A(λ)** (Figura 107) care coincide practic cu cea a sensibilităţii

ochiului în lumină de slabă intensitate (vederea scotopică)(Figura 108).

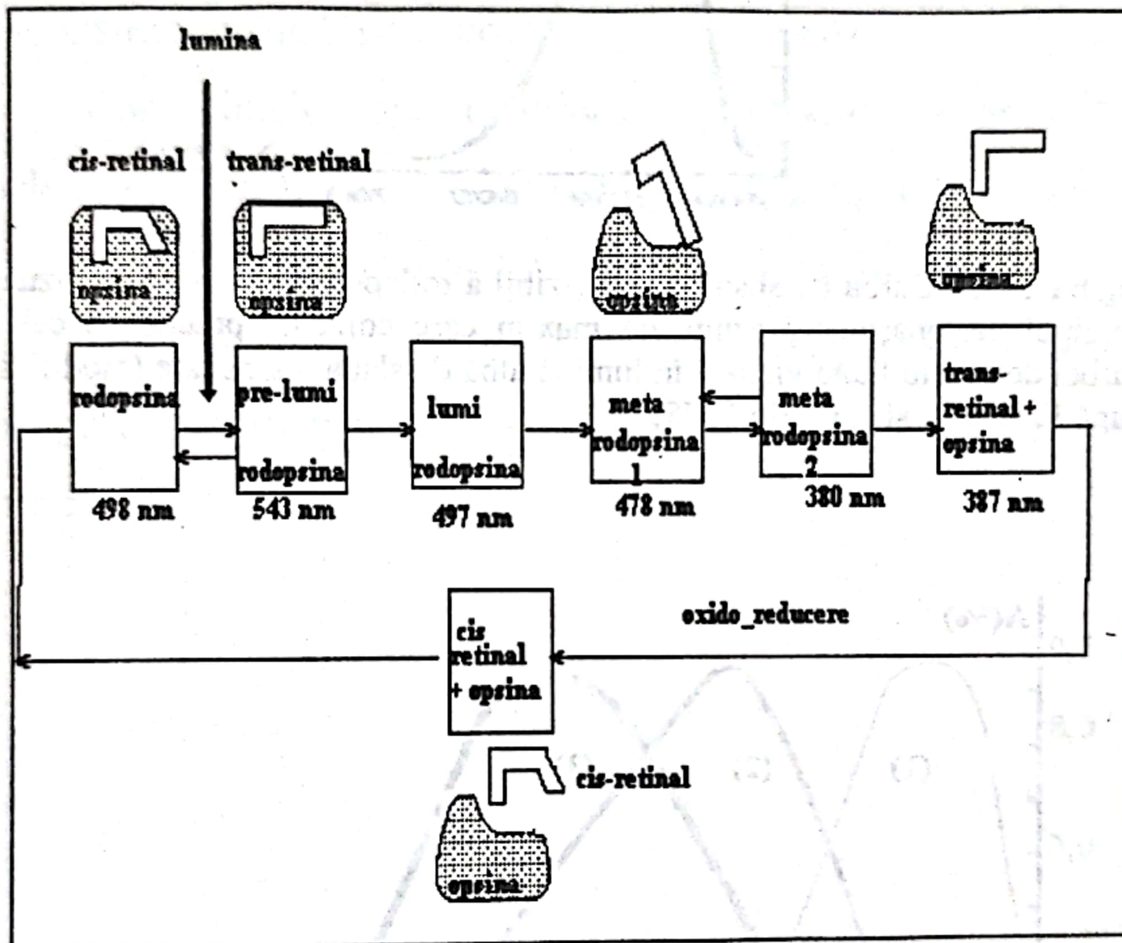


Figura 106. - Schema propusă de Hendrichs pentru ciclul de transformări reversibile ale rodopsinei (modificat după F. Gremy şi J. Perrin 1975)

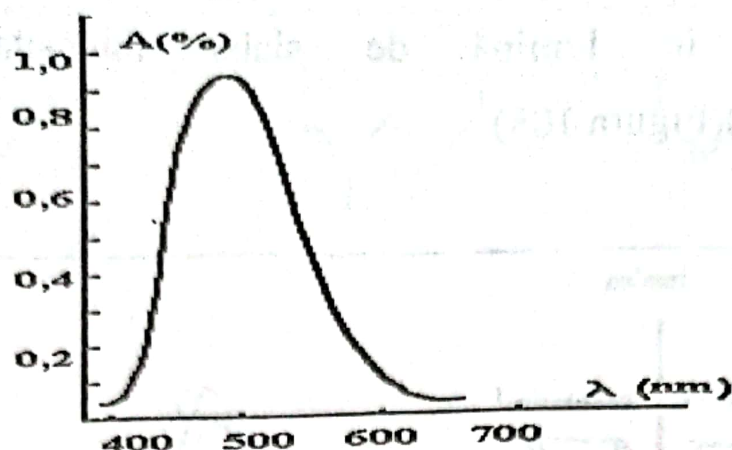


Figura 107. - Curba de absorbţie în vizibil a rodopsinei din celulele vizuale de tipul bastonaşelor prezintă un maxim care coincide practic cu cel al curbei de sensibilitate vizuală în lumină albă de slabă intensitate (modificat. după F. Gremy şi J. Perrin 1975)

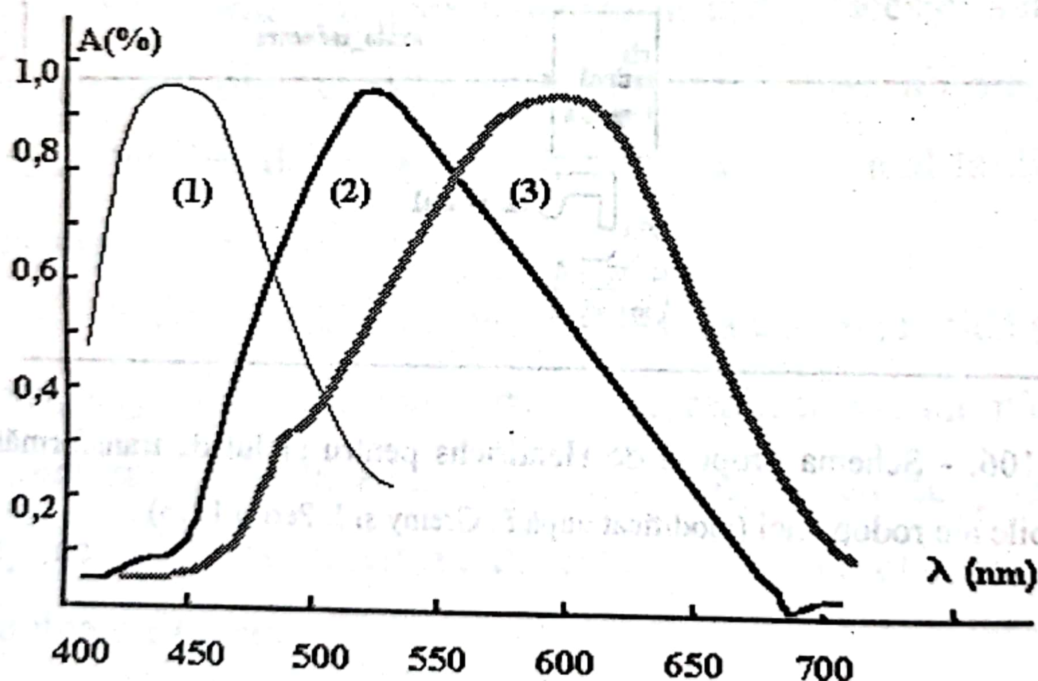


Figura 108. - Curbele de absorbţie ale pigmenţilor fotosensibili din celulele fotoreceptoare de tipul conurilor (modificat după F. Gremy şi J. Perrin 1975)

Mecanismele prin care transformările suferite de pigmenţii fotosensibili duc la activarea unor canale ionice şi la modificarea permeabilităţii membranare pentru fluxurile de ioni nu sunt suficient de bine cunoscute.

Consecinţele sunt nemijlocit legate de fenomenul de bioelectrogeneză în celulele fotoreceptoare şi apoi în celulele neuronale ce fac sinapsă cu fotoreceptorii şi realizează transducţia semnalului luminos în impuls nervos capabil să se propage la centrii nervoşi corespunzători din sistemul nervos central.

CAPITOLUL 16

Biofizica fotorecepției celulare

Celula fotoreceptoare este unul din principalele tipuri de celule excitabile din organism, iar țesutul retinian căruia îi aparține face parte din unul dintre cele mai importante sisteme senzoriale.

La vertebrate și la numeroase nevertebrate de altfel, sistemul vizual este unul dintre cele mai dezvoltate asigurând receptarea a peste 90 % din informația provenită din mediul înconjurător.

16.1. Structura celulei fotoreceptoare

Retina vertebratelor prezintă două feluri de celule fotoreceptoare, cu bastonașe și cu conuri (Figura 109) care diferă prin structura și funcțiile îndeplinite, dar care, în esență funcționează pe baza aceluiași fenomen - fototransducția. Cu toate că energia stimulului luminos absorbit este foarte mică (poate fi vorba chiar de un singur foton) totuși celulele

fotoreceptoare funcţionează ca nişte amplificatoare (de până la 10^6 ori) în baza energiei furnizată de celulă.

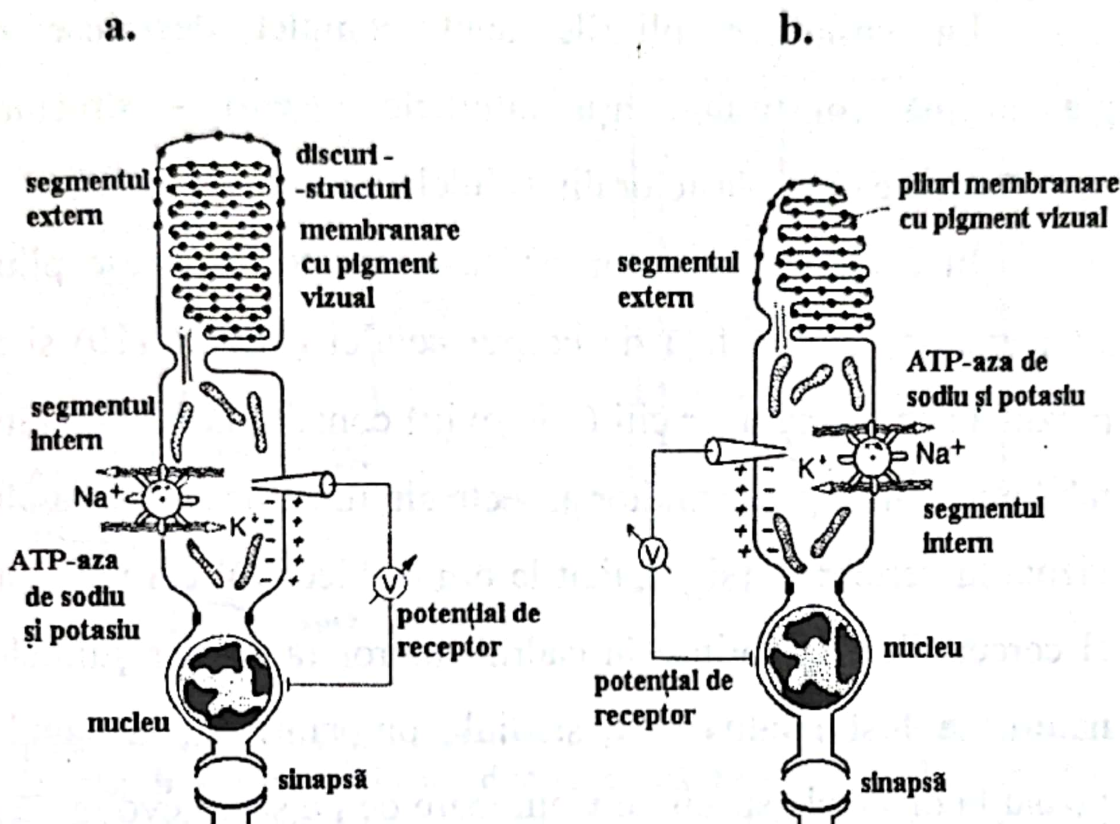


Figura 109. **a** - Celulă fotoreceptoare de tip bastonaş, caracteristică vertebratelor cu lungime de circa 80 microni dintre care 30-40 microni revin segmentului extern. **b** - Celulă fotoreceptoare de tip con, caracteristică vertebratelor (W. Hope şi col. 1983)

Bastonaşele şi conurile de la vertebrate sunt celule care prezintă un segment extern, caracterizat de sute sau chiar mii de pliuri ale membranei celulare în care densitatea de molecule de pigment vizual este considerabilă .

Metabolismul celular se desfăşoară la nivelul segmentului intern unde se găseşte un număr mare de

mitocondrii şi aparatul Golgi care este de asemenea foarte bine reprezentat.

La bastonaşe pliurile sunt complet desprinse de plasmalemă constituind aşa numitele discuri - structural asemănătoare cloroplastelor din celulele plantelor superioare.

În cazul fotoreceptorilor nevertebratelor, aceste pliuri sunt aranjate lateral faţă de corpul celulei (Figura 110) şi se prezintă sub forma unor cili (microvili) constituind aşa numitul rabdomer. Înţelegerea multor aspecte ale funcţionării aparatului vizual la vertebrate (şi implicit la om - obiectivul cel mai înalt al cercetărilor întreprinse în cadrul tuturor ramurilor ştiinţelor naturii) a fost facilitată de studiul comparativ al sistemului vizual la diversele specii de vieţuitoare de pe scara evolutivă şi în special, este vorba de nevertebratele superioare cum sunt artropodele şi insectele.

În toate situaţiile, membrana bogată în molecule de rodopsină, este compusă din circa 50% proteine, dintre care unele cu activitate enzimatică (ATP-aze, GTP-aze), circa 45 % lipide (fosfatidilcolină, fosfatidiletolamină) şi câteva procente de colesterol. Dintre proteine circa 30 % sunt hidrosolubile, iar cele insolubile în apă 80-90% sunt molecule de rodopsină (prezentate într-un alt capitol în care am evidenţiat existenţa

diferitelor tipuri de rodopsină, atât în fotoreceptorii vertebratelor cât şi a nevertebratelor - xantopsina).

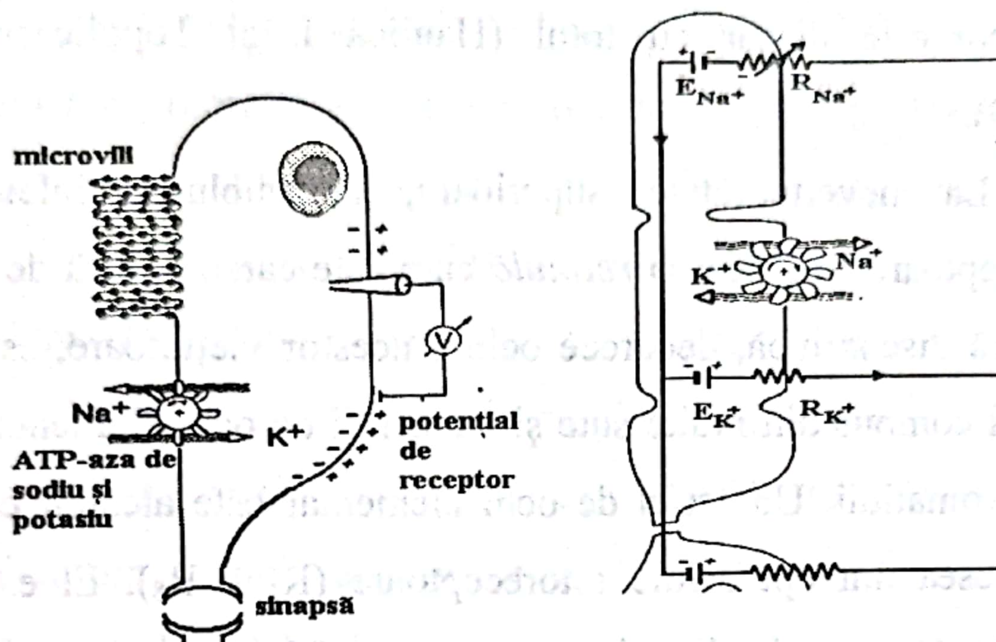


Figura 110. **a** - celula fotoreceptoare la nevertebrate (lungime de circa 200 microni); **b** - curenţii ionici dintr-o celulă bastonaş de la vertebrate. Membrana segmentului intern este mai permeabilă pentru potasiu (extruzie masivă, inclusiv la nivelul sinapsei) în timp ce membrana segmentului extern este mai permeabilă pentru sodiu (intruzie puternică) (W. Hope şi col. 1983)

16.2. Structura retinei

Ansamblul celulelor fotoreceptoare de la vertebrate formează un ţesut continuu, *retina*, în cadrul căruia însă distribuţia bastonaşelor şi a conurilor nu este uniformă.

Conurile prezintă o mare densitate în regiunea centrală şi ocupă în exclusivitate zona mijlocie a acestei regiuni - fovea centralis.

Bastonaşele au o densitate din ce în ce mai mare de la marginile regiunii centrale către zonele periferice ale retinei unde conurile dispar cu totul (Haulică I. şi Topoliceanu F.,1999).

La nevertebratele superioare, ansamblul celulelor fotoreceptoare formează o *retinulă* care este caracterizată de o structură discontinuă, deoarece ochiul acestor vieţuitoare, este un ochi compus din multe sute şi chiar mii de ochi elementari numite omatidii. Un astfel de ochi elementar este alcătuit cel mai adesea din opt celule fotoreceptoare (R_1 – R_8). El este acoperit de un cristalin şi o cornee, astfel că aspectul de ansamblu al ochiului compus este cel al unui ochi faţetat. Cele opt celule fotoreceptoare nu sunt identice, dar cele şase de la periferia omatidiei au sensibilitate sporită pentru lungimi de undă mici şi intensităţi luminoase mici, în timp ce cuplul de fotoreceptori centrali, suprapuşi, prezintă sensibilitate sporită pentru radiaţia luminoasă cu lungimi de undă mai mari şi fluxuri cu intensităţi relativ mari. Aceste două celule nu sunt identice nici din punctul de vedere al sensibilităţilor spectrale ale fotoreceptorilor şi nici pe toată suprafaţa ochiului compus. De exemplu, la multe specii de insecte de tipul dipterelor (ex.: Drosophila melanogaster), există două populaţii de celule fotoreceptoare centrale, care apar distincte la microscopul cu

fluorescenţă. La unele specii de diptere, ochii prezintă un dimorfism sexual, astfel că masculul prezintă în plus faţă de femelă, o zonă a ochiului în care celulele fotoreceptoare prezintă o coloraţie specială şi o sensibilitate spectrală care include într-un al treilea tip de populaţii de fotoreceptori.

La vertebrate celulele din retină fac sinapsă cu celule bipolare (*bipolare propriu-zise, orizontale şi amacrine*), iar acestea în continuare cu celulele multipolare (*ganglionare*).

La nevertebrate celulele din retinulă fac sinapsă cu celulele din primul ganglion optic (*lamina)* cu excepţia celor două centrale. Celulele din lamina ca şi cele două celule centrale fotoreceptoare din fiecare omatidie fac sinapsă în ganglionul de ordinul doi (*medula*), care este urmat de cel de-al treilea ganglion optic - *lobula*.

16.3. Cuplarea transformărilor rodopsinei cu modificările potenţialului de membrană

Mecanismul cuplării reacţiilor biochimice suferite de rodopsină cu modificările de potenţial electric ale membranei celulei fotoreceptoare este în mare măsură insuficient cunoscut până acum, dar este plauzibil ca *transformările*

conformaţionale ale rodopsinei să determine modificări ale *momentului dipolar electric* al acestei molecule.

Câmpul electric modificat al acestui dipol poate fi în mod direct sau mai probabil, indirect, elementul care duce la declanşarea activării unor canale ionice din membrana fotoreceptoare şi, ca urmare a schimbărilor de permeabilitate ale membranei pentru diferiţi cationi. De aici, rezultă şi variaţia potenţialului electric de membrană respectiv apariţia potenţialului de acţiune - potenţialul de receptor.

La vertebrate, în lipsa stimulului luminos, potenţialul electric de membrană (potenţial de repaus - de întuneric) este în principal un potenţial de difuzie, de altfel ca şi la nevertebrate. Există o permanentă diferenţă între valorile potenţialului de repaus de la nivelul segmentului extern şi al celui intern al celulei fotoreceptoare (*potenţialul de membrană este mai mare pentru segmentul intern decât pentru cel extern*). De aceea, este semnalată o permanentă circulaţie a ionilor de sodiu şi potasiu (curent ionic de membrană) după cum se arată şi în Figura 110.

După absorbţia luminii în moleculele de rodopsină permeabilitatea membranei scade (în primul rând *scade permeabilitatea membranei segmentului extern pentru sodiu*) şi imediat scade şi curentul ionic transmembranar, ceea ce duce în

final, la *o hiperpolarizare a membranei* - potenţialul de acţiune este mai mare decât la întuneric.

Ionii de calciu sunt susceptibili de a juca un rol important în cuplarea transformărilor rodopsinei - localizată la nivelul discurilor, fără contact direct cu membrana celulară - cu controlul unor canale ionice membranare. Dacă este aşa, atunci ionii de calciu, eliberaţi ca urmare a acţiunii luminii asupra rodopsinei, ar fi cei care determină inactivarea unor canale de sodiu (Haulică I. şi Topoliceanu F., 1999).

Unele cercetări experimentale arată că modificările rodopsinei, determină activarea unei enzime de tip fosfodiesterază care determină o scădere a concentraţiei citoplasmatice de *guanozin monofosfat ciclic (cGMP)* care, la rândul său ar determina blocarea canalelor de sodiu.

La nevertebrate, în lipsa stimulului luminos, membrana fotoreceptorilor prezintă o mare permeabilitate faţă de potasiu (canale ionice "de întuneric") care este principalul responsabil de potenţialul de întuneric. Absorbţia luminii determină o *creştere a permeabilităţii membranare pentru sodiu* ceea ce va duce în final la o depolarizare a membranei.

Rolul *ionilor de calciu* este presupus a fi foarte important şi în acest caz. La întuneric ei ar putea bloca canalele de sodiu (unii autori le numesc chiar canale "de lumină"

deoarece sunt activate de absorbţia luminii). Absorbţia luminii ar putea determina o creştere a afinităţii feţei externe a membranei pentru sodiu şi o descreştere simultană a afinităţii pentru calciu. Repolarizarea este asigurată de creşterea ulterioară a permeabilităţii pentru potasiu.

O altă ipoteză formulată în legătură cu mesagerii fototransducţiei la nevertebrate se referă la rolul *cGMP*-ului. Unele cercetări au arătat că se pot activa canale ionice sensibile la lumină prin creşterea concentraţiei de cGMP (A. Richardson şi C. W. Taylor 1993, citaţi de R. C Hardie şi B. Minke), iar prin utilizarea unor compuşi farmaceutici capabili să afecteze metabolismul nucleotidelor ciclice se poate influenţa răspunsul fotoreceptorilor la lumină. Interpretarea care s-a dat acestor fapte constă în a admite că există unele canale ionice sensibile la lumină şi cu poartă controlată de nucleotidele ciclice şi blocata de unii ioni bivalenţi.

Constatarea că în cazul *Drosophilei melanogaster* canalele sensibile la lumină sunt în mod particular permeabile pentru calciu, se poate corela cu un fenomen evidenţiat la multe tipuri de celule neexcitabile de la vertebrate. Este vorba de faptul că *activarea transformărilor fosfoinozitidelor* este asociată şi cu deschiderea canalelor de calciu din membrana celulară iar influxul de calciu care se produce determină

reumplerea depozitelor intracelulare şi menţine răspunsul fiziologic. Dar activarea acestui mecanism este încă incomplet clarificată şi singurul model fenomenologic ce aduce unele certitudini este cel numit *intruzia capacitativă a calciului.*

Conform acestui model, semnalul determinant al excitaţiei, nu este creşterea calciului intracelular, ci epuizarea rezervelor de calciu din cisternele intracelulare sensibile la *inozitoltrifosfat* (IP_3). Acest model a fost elaborat, ca urmare a datelor experimentale obţinute din teste bazate, pe introducerea ionoforetică a calciului în celulă şi blocarea pompelor de calciu din membranele depozitelor intracelulare. Dar chiar şi în ipoteza veridicităţii acestui model nu se poate elucida total mecanismul fototransducţiei la nevertebrate şi mai ales rămîne deschisă o problemă ridicată de multă vreme şi anume modul în care eliberarea calciului din depozitele submicrovilare duce la transmiterea semnalului la nivelul membranei celulare.

O explicaţie ar putea fi legată de existenţa unui alt mesager difuzifbil, aşa numitul *factor de influx al calciului* (CIF) (C. Randrimampita şi R. Y. Tsien 1993, citaţi de R. Hardie şi B. Minke). O altă explicaţie, mai radicală, este bazată

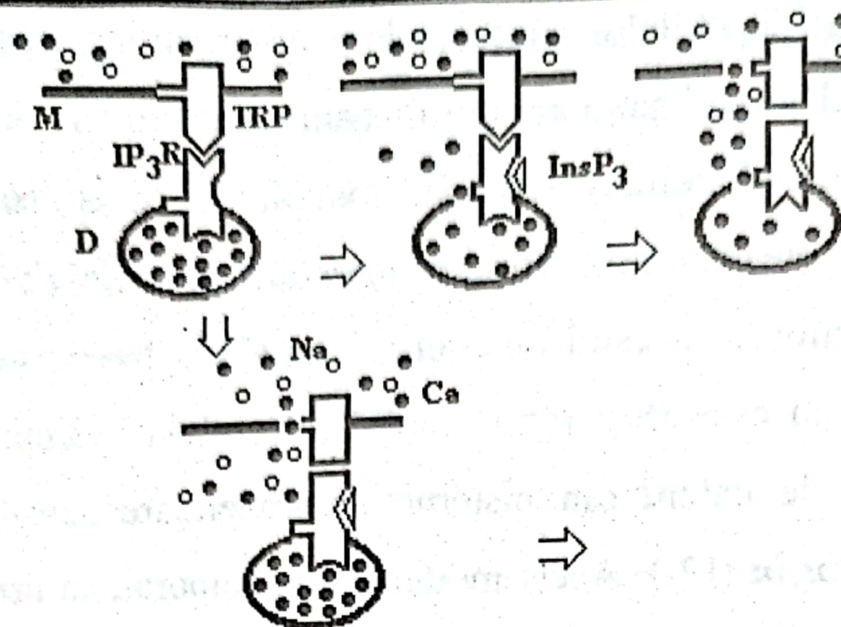


Figura 111. - Modelul de cuplare conformaţională a intruziei capacitative a calciului. Canalul de intrare a calciului din mediul extracelular prin membrana celulară, **M**, este proteina **TRP** controlată de gena ***trp***. Acest canal este cuplat la membrana depozitului intracelular submicrovilar, **D**, prin interacţiune directă cu receptorul **IP_3R** pentru inozitoltrifosfat, **IP_3**, aflat în membrana depozitului. Controlul porţii canalului se realizează prin intermediul schimbărilor conformaţionale ale receptorului pentru inozitoltrifosfat. Astfel, inozitoltrifosfatul declanşează eliberarea calciului intracelular şi golirea depozitelor submicrovilare. Un situs de legare a calciului situat la terminalul receptorului pentru inozitoltrifosfat sesizează diminuarea concentraţiei de calciu din depozit şi determină a modificare conformaţională a canalului de calciu din membrana celulara ceea ce duce la intruzia calciului extracelular sau, direct **IP_3** determină intruzia calciului în celulă (modificat după R. C. Hardie 1994)

pe ideea, că în membrana celulară există canale de calciu (proteinele TRP) legate de receptorii pentru inozitoltrifosfat (Figura 111) din membranele microvilare cu care interacţionează şi de către care sunt controlate, iar situsurile de

legare a calciului la receptorul pentru inozitoltrifosfat pot acţiona ca senzori pentru calciul din depozite.

Se poate sublinia că potenţialul genetic deosebit al *Drosophilei melanogaster* a constituit un punct de bază în studiile menite să precizeze mecanismele transformărilor fosfoinozitidelor implicate în fototransducţia de la diptere. Astfel, gena *trp* ar fi cea care controlează o categorie de canale de calciu reglate de fosfoinozitide şi descoperirea recentă a unor gene analoage în creierul şoarecelui (C. H. Petersen et al., 1995,) pot susţine unele analogii cu mecanismele de reglare mediate de aceste substanţe la vertebrate.

16.4. Potenţiale de acţiune şi curenţi ionici de excitaţie

Înregistrări ale potenţialelor de membrană s-au efectuat preponderent la nevertebrate, care prezintă celulele fotoreceptoare de dimensiuni mult mai mari decât vertebratele (cu tehnica sugerată în Figurile 109 şi 110, bazată pe introducerea unui microelectrod în interiorul celulei) şi, dintre vertebrate, la câteva specii de peşti care prezintă celule fotoreceptoare considerabil mai mari decât la alte vertebrate.

Înregistrări ale curenţilor transmembranari (Figura 112) au fost efectuate prin metoda potenţialului fixat sau prin sucţia

unei celule într-un electrod adecvat, reuşindu-se a se evidenţia variaţia intensităţii curentului ca urmare a iluminării, atât la celulele fotoreceptoare de la vertebrate (D.A. Baylor şi col. 1979) (citat de W. Hope şi col 1983.) cât şi de la nevertebrate.

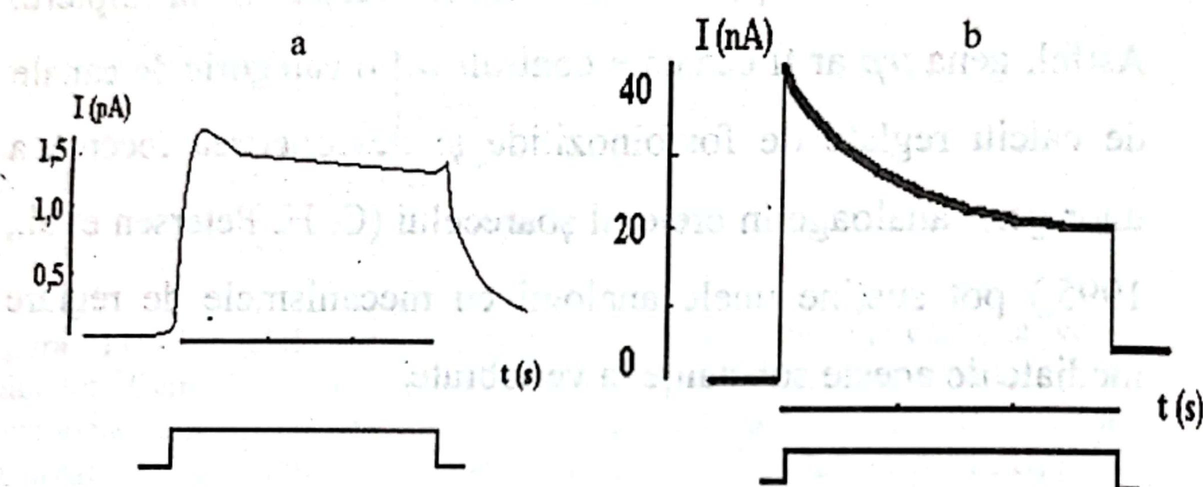


Figura 112. **a** - Curentul ionic transmembranar înregistrat folosind un electrod de sucţie la celulă cu bastonaş. **b** - Curent ionic transmembranar înregistrat la potenţial fixat,de valoare pozitivă, la nevertebrate (după W. Hope şi col. 1983). Este reprezentat şi stimulul luminos, în partea de jos a figurii.

De asemenea, au fost studiate prin aceste tehnici şi potenţialele de acţiune de la nivelul celulelor bipolare propriu-zis, orizontale şi amacrine (hiperpolarizări) şi ganglionare (depolarizări) din retina vertebratelor precum şi la nivelul celulelor din primul ganglion optic, lamina, de la nevertebrate

(unde, spre deosebire de fotoreceptori, se produce o hiperpolarizare).

Informaţii globale asupra bioelectrogenezei ochiului se pot obţine din înregistrări extracorneene de potenţial electric cu electrozi de suprafaţă - înregistrări electroretinografice (ERG). În Figurile 113, 114 şi 115 sunt date răspunsurile extracorneene faţă de stimulii luminoşi rectangulari, atât la vertebrate (om) cât şi la nevertebrate (*Drosophila melanogaster*).

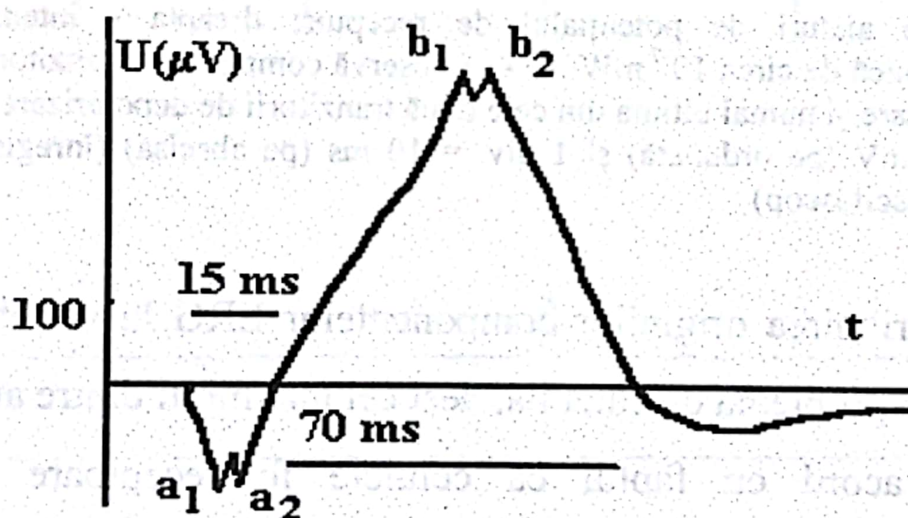


Figura 113. - Electroretinograma umană pentru stimul luminos unic cu durata de 0,1 secunde. Undele a_1 şi a_2 apar ca nişte deflexiuni negative faţă de potenţialul de repaus al corneei (pozitiv) în timp ce undele b_1 şi b_3 apar ca nişte unde pozitive. Amplitudinea nu depăşeşte 1 mV(după F. Gremy 1982).

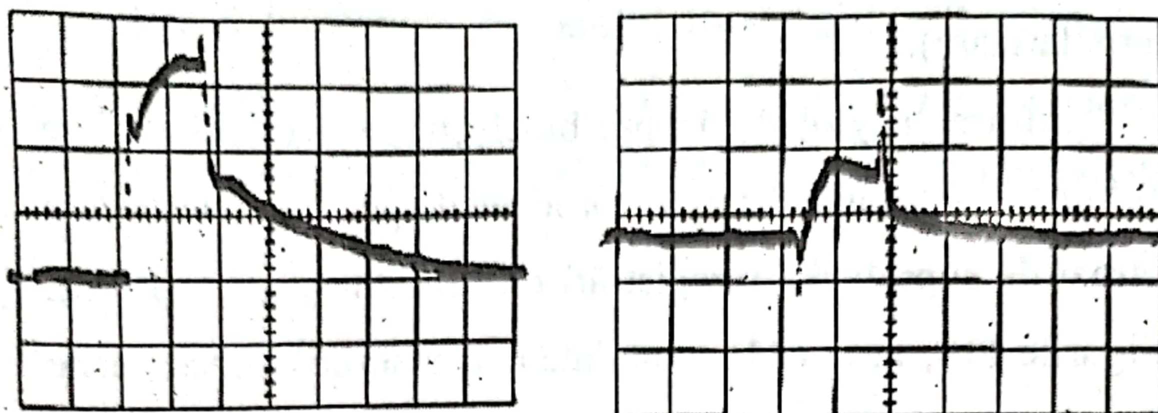


Figura 114.- Electroretinograma obţinută la *Drosophila melanogaster* pentru stimul luminos unic, cu durata de 1 secundă (stânga - intensitate luminoasă mare, de circa 10^{-5} mW/m^2 -se observă două componente tranzitorii de depolarizare alături de potenţialul de receptor; dreapta - intensitate luminoasă mică de circa 10^{-7} mW/m^2 - se observă componenta tranzitorie de hiperpolarizare şi numai ultima din cele două tranzitorii de depolarizare)
1 div. = 5 mV (pe ordonată) şi 1 div. = 10 ms (pe abscisă) (înregistrare proprie pe osciloscop)

Atribuirea originilor componentelor ERG la vertebrate este încă o problemă discutabilă, deşi cei mai mulţi dintre autori sunt de acord cu faptul că celulele fotoreceptoare sunt responsabile de componentele a_1-a_2 , iar celulele bipolare sunt responsabile de componentele b_1-b_2.

La vertebrate componentele tranzitorii, foarte rapide, sunt legate de bioelectrogeneza din celulele ganglionului optic lamina (hiperpolarizarea este atribuită unei creşteri a conductanţei pentru clor iar depolarizările se atribuie creşterilor

de conductanţă pentru sodiu sau calciu). Potenţialul de receptor este atribuit în principal celulelor fotoreceptoare.

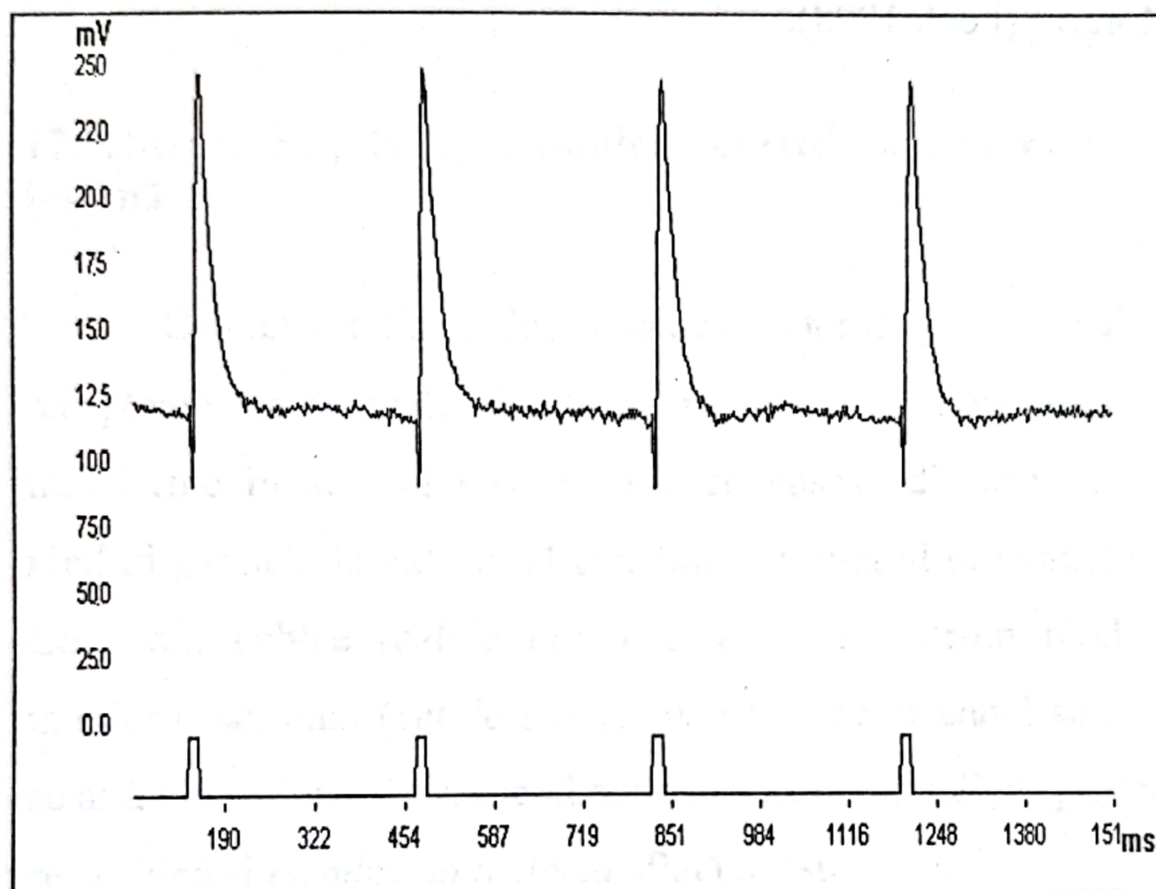
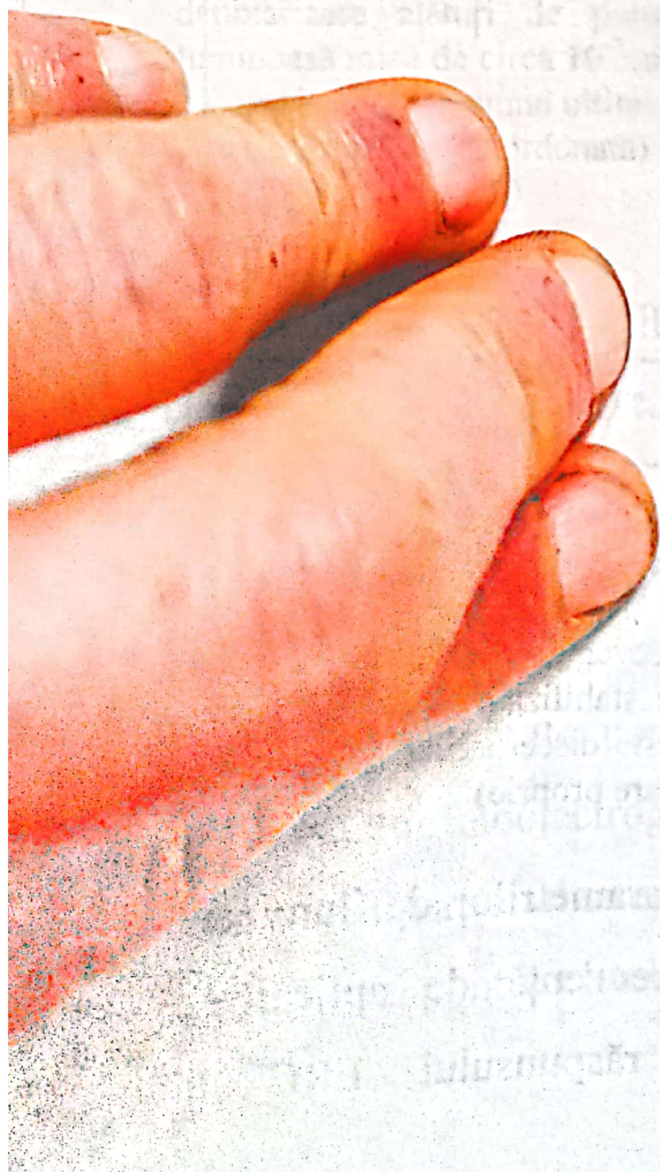


Figura 115. - Achiziţie computerizată de semnal ERG obţinut la *Drosophila melanogaster* pentru excitare luminoasă în regim de stimuli identici (intensitatea de 10^{-5} mW/m^2) repetaţi cu o frecvenţă de 8 Hz (înregistrare proprie). Componenta de hiperpolarizare este stabilizată dar structura tripartită a semnalului de depolarizare nu mai este discernabilă. În partea de jos a figurii se vede stimulul luminos (înregistrare proprie)

Cercetările asupra influenţei parametrilor de iluminare (intensitate, compoziţie spectrală, frecvenţă de aplicare a stimulilor) asupra amplitudinilor răspunsului ERG al

Drosophilei melanogaster au preocupat şi pe autorii acestei lucrări (M. Isac şi col. 1997; D. E. Creangă şi col. 1997; D. E. Creangă 1998; J. C. Sprott şi col. 1999; D. E. Creangă, V. V. Morariu şi col. 1998).



CAPITOLUL 17

Elemente de biofizică auditivă

17.1. Structura şi funcţiile celulelor ciliate din urechea internă

Celulele ciliate din urechea internă sunt celulele receptoare ale semnalului acustic, pe care sunt capabile să îl transforme în semnal electric. Ele se găsesc dispuse în trei rânduri paralele la exteriorul canalului spiralat al organului lui Corti din cohlee (*celule ciliate externe*) şi într-un rând la interiorul acestuia (*celule ciliate interne*). Acest canal spiralat se află plasat între două membrane, *membrana bazilară* pe care se sprijină şi *membrana tectoria* aflată deasupra sa.

Celulele ciliate sunt prevăzute cu nişte *stereocili şi un kinocil* (care la mamifere se resoarbe în faza embrionară) care pătrund în membrana tectoria.

Semnalul acustic (unda sonoră) este generatorul unei presiuni mecanice care acţionează asupra membranei bazilare determinând o deplasare a acesteia faţă de membrana tectoria. Există câteva deosebiri morfologice între cele două tipuri de

celule ciliate. Cele externe sunt mai subţiri, alungite şi nu sunt înconjurate strâns de multe celule suport (Figura 116).

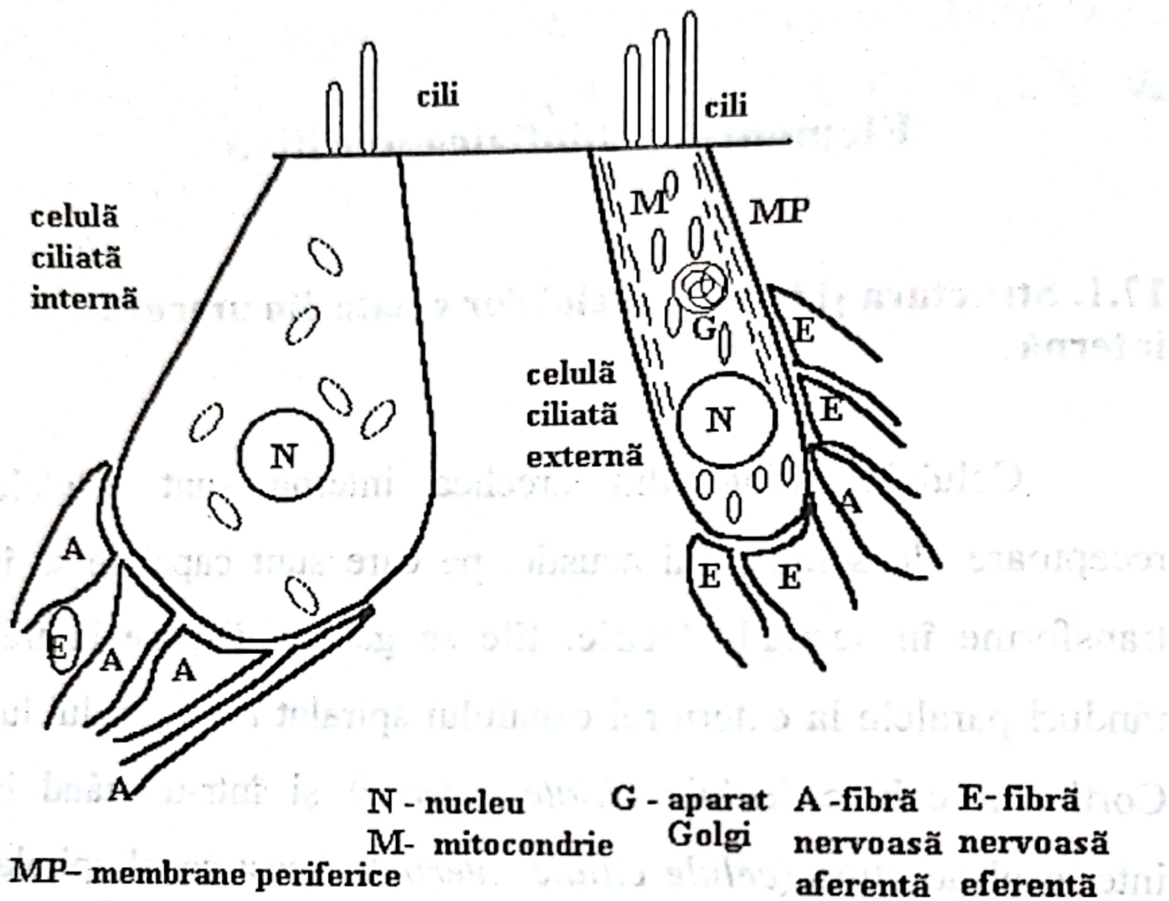


Figura 116. - Structura celulei ciliate interne şi celulei ciliate externe (modificat după W. Hope şi col. 1983)

Există şi deosebiri ultrastructurale între cele două tipuri de celule şi, în plus, sinapsele aferente celulelor interne sunt sinapse chimice obişnuite spre deosebire de sinapsele celulelor externe, ceea ce sugerează că aceste două tipuri de celule pot avea funcţii diferite.

Majoritatea celulelor nervoase aferente (circa 90%) fac sinapsă cu celulele ciliate interne, fiecare dintre acestea fiind conectată cu câte 20 astfel de fibre nervoase aferente. Fibrele nervoase aferente celulelor ciliate externe nu ajung la creier, ci la ganglionul spiral al cohleei, ceea ce ar putea sugera (din punct de vedere evoluţionist), că această inervaţie a celulelor ciliate externe este în curs de degenerare (Figura 117). Este posibil ca celulele ciliate externe să aibă o funcţie localizată la nivelul organului lui Corti adică să influenţeze, direct sau indirect, pe cele interne care transmit informaţia la creier.

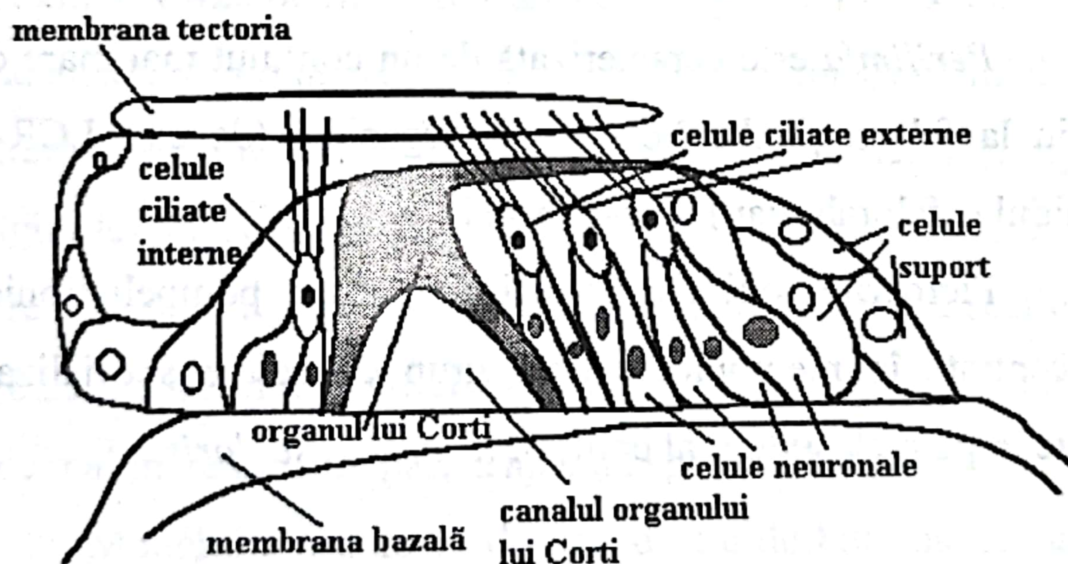


Figura 117. - Reprezentare schematică a dispunerii relative a celulelor ciliate şi celor două membrane, membrana bazilară şi membrana tectoria (modificat după V. Gheorghe şi A. Popescu 1990)

Există dovezi experimentale, că celulele nervoase eferente care fac sinapsă în celulele ciliate externe pot cauza inhibiţia celulelor ciliate interne, deşi nu s-a găsit o conexiune directă între cele două tipuri de celule ciliate.

Celulele ciliate sunt în contact cu două medii lichide diferite: *endolimfa* ce umple cavitatea dintre organul lui Corti şi membrana tectoria şi *perilimfa* ce umple cavitatea dintre organul lui Corti şi membrana bazilară.

Endolimfa este în contact cu lichidele din spaţiile sistemului vestibular şi este caracterizată de un mare conţinut de ioni de potasiu.

Perilimfa este caracterizată de un conţinut mai mare de sodiu la fel ca şi alte lichide din organism (de ex.: LCR – lichidul cefalorahidian) cu care este în contact.

Pierderile ionice sunt echilibrate de pompele ionice concentrate în membranele unui grup de celule specializate aflate în peretele extern al cohleei, în *stria vascularis*.

17.2. Hidrodinamica urechii interne

Presiunea mecanică exercitată de unda sonoră asupra structurilor din urechea externă şi medie se transmite la nivelul

structurilor din urechea internă determinând oscilaţii ale membranei bazilare (Haulică I. şi Topoliceanu F.,1999).

Georg von Bekesy (Premiul Nobel pentru investigarea mecanismelor percepţiei auditive) a confirmat o ipoteză emisă anterior de Helmholtz referitor la frecvenţele undelor sonore care pun în mişcare diverse porţiuni ale acestei membrane, sunetele de frecvenţe mari inducând oscilaţii în extremitatea dinspre *fereastra ovală,* iar cele de frecvenţe mici în extremitatea opusă (lângă *helicotrema*).

Membrana bazilară este formată dintr-o serie de aproximativ 42.000 de fibre transversale prinse într-o substanţă fundamentală omogenă. Aceste fibre au lungimi mici în extremitatea din zona ferestrei ovale (40 microni), apoi lungimile cresc progresiv ajungând la 500 microni în extremitatea din zona helicotremei (un orificiu cu aria secţiunii de 0,25 - 0,40 mm^2), astfel că membrana are o grosime din ce în ce mai mare dinspre partea apicală spre cea bazală.

Modelul mecanic ce descrie destul de bine modalitatea de oscilaţie a membranei bazilare este cel al unei serii de pendule mecanice de diferite lungimi (crescătoare progresiv) şi diferite dimensiuni şi mase ale corpului sferic suspendat, aflate în contact mecanic (Figura 118). Se consideră că toate primesc

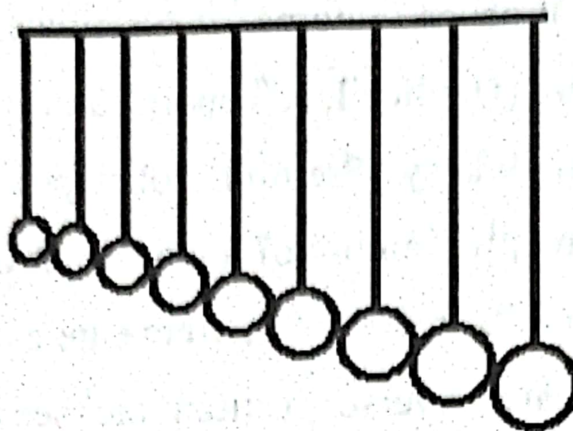


Figura 118. - Modelul mecanic propus de von Bekesy pentru explicarea oscilaţiilor membranei bazale

simultan un impuls mecanic perpendicular pe planul în care sunt suspendate (vertical) - de la o bară orizontală. De aceea pendulele intră în vibraţie cu frecvenţe diferite, cu faze diferite şi chiar cu amplitudini diferite, oscilaţiile lor nefiind independente - undă progresivă, iar nu staţionară (ce se propagă de la pendulul mai scurt şi mai uşor la cel mai lung şi mai greu), (Haulică I. şi Topoliceanu F., 1999).

Dacă frecvenţele variază liniar de la o extremitate la alta, amplitudinile sunt mici lângă fereastra ovală (zona apicală a membranei bazilare), ating un maxim şi apoi scad din nou lângă helicotremă (zona bazală a membranei bazilare).

17.3. Bioelectrogeneza celulelor ciliate

Poziţiile relative ale celor două membrane, bazilară şi tectoria, diferite în funcţie de solicitarea mecanică a stimului sonor, determină apariţia unor forţe de încovoiere ce acţionează asupra cililor îndoindu-i într-o parte sau cealaltă. Ca urmare, în celulele ciliate apar potenţiale electrice de acţiune care pot fi atât depolarizări cât şi hiperpolarizări electrice ale membranei celulare.

Depolarizările apar când cilii se îndoaie către kinocil iar hiperpolarizările când cilii se îndoaie în sens opus kinocilului. În primul caz celulele nervoase cu care fac sinapsă celulele ciliate sunt excitate, în al doilea caz nu sunt excitate, ci sunt inhibate.

Potenţialul membranar de repaus nu este modificat de forţele ce acţionează perpendicular pe cili. Valoarea acestui potenţial de repaus din celulele ciliate ca şi din cele neuronale este de circa - 60 mV.

Undele sonore de intensitate şi frecvenţă adecvată particularităţilor de percepţie a fiecărei specii determină apariţia potenţialelor de acţiune (potenţiale de receptor) caracterizate atât de o componentă continuă cât şi de una alternativă.

La frecvenţe relativ joase, raportul dintre amplitudinea componentei alternative şi a celei continue este de 1/7. Potenţialele de receptor determină eliberarea de neurotransmiţător în sinapsa nervoasă aferentă.

Înregistrări electrofiziologice la nivelul cohleei au arătat că în *stria vascularis* este generat un potenţial electric pozitiv de 80-100 mV, măsurat în raport cu perilimfa, caracterizat de asemenea de două componente, una continuă şi una alternativă.

Măsurători asupra mişcării membranei bazilare, efectuate prin intermediul efectului Mössbauer au adus unele date suplimentare relativ la comportarea în domeniul amplitudinilor mari ale acestor mişcări. S-a detectat atât o componentă liniară cât şi una neliniară.

Neliniarităţile au fost evidenţiate prin metode psihoacustice, în special pentru nivele înalte de intensitate sonoră. Pe de altă parte, la unele specii de mamifere, neliniarităţile s-au evidenţiat sub forma apariţiei unei curbe de saturaţie , dar numai pentru sunete sub 70 dB(Figura 119).

Investigaţii neurofiziologice la nivelul celulelor ciliate, a unor fibre nervoase şi a unor celule nucleate din cohlea, au arătat neliniarităţi semnificative, atât la nivelul potenţialelor de acţiune continue cât şi a celor alternative. Astfel, aceste potenţiale, ca şi rata lor de descărcare în fibrele nervoase, cresc

repede după ce trec de un anume prag, dar se saturează la o anumită valoare a intensităţii stimulului sonor. Acest rezultat este aproape independent de frecvenţă şi de specia de animal investigat.

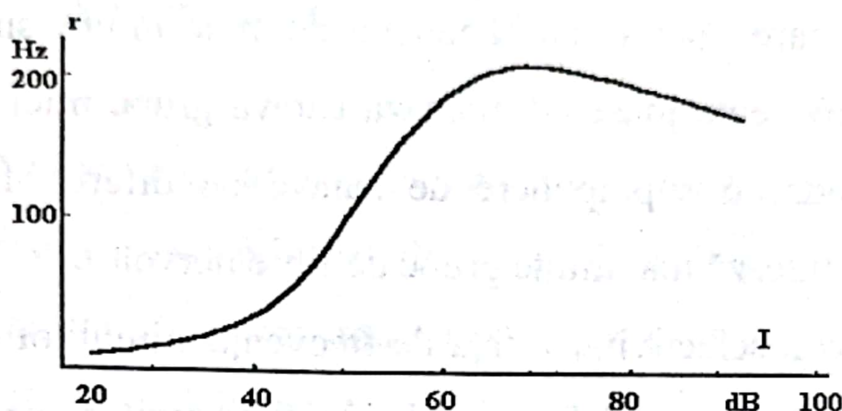


Figura 119. - Rata de descărcare, r, a impulsurilor electrice printr-o fibră nervoasă în funcţie de intensitatea stimulului sonor, I, este o curbă saturată

În concluzie, cel mai probabil este că, deşi mişcarea membranei bazilare este în principal liniară, componenta neliniară ar putea să fie dată de mişcarea membranei tectoria şi a organului lui Corti.

17.4. Procesarea informaţiei auditive în sistemul nervos central

Fibrele nervoase care transmit semnalele receptate la nivelul urechii interne sunt în număr de circa 30.000 şi principalele diferenţe dintre anumite categorii de astfel de fibre

sunt legate mai ales de pragul de frecvență. Partea bazilară a fibrei este cea care are rolul determinant în selectivitatea unui grup de fibre nervoase față de frecvențele sunetelor prelucrate şi transmise ca semnale electrice la creier. Astfel un sunet complex care este o suprapunere de mai multe sunete cu diferite frecvențe joase, stimulează câteva grupe mici de fibre nervoase dar o suprapunere de sunete de diferite frecvențe înalte stimulează mai multe grupe de fibre nervoase.

Deci, selectivitatea față de frecvența stimulilor este mai mare pentru domeniul frecvențelor mici şi mult mai redusă în domeniul frecvențelor mari. De asemenea fibrele nervoase auditive pot să difere prin sensitivitate. Totuşi într-un domeniu de frecvențe dat, pragul de sensibilitate al fibrelor diferă puțin (cu până la 20 dB), astfel că se poate presupune că un stimul care are o intensitate cu 20 dB peste pragul celei mai sensibile fibre este capabil să stimuleze toate fibrele din zonă. Spre deosebire de sistemul vizual, descărcarea din nervul auditiv nu conține nici o informație despre localizarea spațială a sursei.

CAPITOLUL 18

Biofizica contracţiei musculare

Celulele musculare (fibrele musculare) s-au diferenţiat la organismele superioare din regnul animal, odată cu dezvoltarea unui sistem muscular specializat în efectuarea funcţiei de motricitate. Nu trebuie de uitat că sisteme contractile există aproape la toate celulele vii, manifestându-se la nivelul întregii celule (amibele, spermatozoizii, ş.a., care se deplasează în mediul extern) sau la nivelul unor organite celulare (mitocondrii, cloroplaste, ş.a. care îşi modifică forma şi volumul) - motilitatea manifestându-se ca o însuşire generală a materiei vii.

În marea majoritate a cazurilor, contracţia spaţială este efectuată de complexul de proteine actină - miozină, capabil de tranziţii din stări conformaţionale extinse în stări conformaţionale restrânse, cu consum de energie din reacţiile exergonice cu care este cuplat, de exemplu hidroliza ATP-ului.

18.1. Structura fibrei musculare striate

Muşchiul striat este alcătuit dintr-un număr mare de celule musculare, celule alungite (cu lungimea de până la câţiva cm) aranjate paralel cu direcţia de contracţie. Fiecare celulă musculară este prevăzută cu mai mulţi nuclei, situaţi marginal, către membrană (sarcolema).

Elementele contractile sunt organitele celulare specifice numite *miofibrile*. Miofibrilele sunt alcătuite din filamente groase de *miozină* (câte 400 de molecule de miozină în constituţia fiecărui filament gros), în jurul fiecărui filament gros fiind dispuse câte şase filamente subţiri, de *actină*.

La examinare cu ajutorul microscopului optic cu contrast de fază sau cu lumină polarizată miofibrilele prezintă un aspect striat - o alternanţă de zone opace, întunecate şi zone luminoase sau izotrope. Zonele luminoase sunt denumite zone I (izotrope, care refractă slab lumina) şi sunt traversate de o linie întunecată - stria Amici, notată cu Z. Ele sunt alcătuite din filamente de actină. Zonele întunecate sunt denumite zone A (anizotrope, care refractă puternic lumina) şi sunt alcătuite din filamente de miozină (Figura 120).Ele prezintă o bandă centrală

mai luminoasă, banda H (banda Hensen) care la rândul său are la mijloc o linie întunecată, linia M (Figura 121).

Între două linii Z consecutive este delimitat un sarcomer a cărui lungime ajunge la 2 microni. Reticulul endoplasmic (sarcoplasmic) din celula musculară striată prezintă un sistem de canalicule longitudinale (tubuli L) şi transversale (tubuli T).

Tubulii T comunică cu exteriorul dar nu şi tubulii L. Aceştia din urmă prezintă numeroase anastomoze iar la nivelul joncţiunii dintre zonele I şi zonele A prezintă nişte cisterne transversale în care se acumulează calciul ionic.

Complexele structurale şi funcţionale alcătuite din cisternele derivate din tubulii L şi terminaţiile tubulilor T se numesc triade şi la studiul şi caracterizarea lor o contribuţie semnificativă a revenit şi savantului de origine română George Emil Palade (Premiul Nobel 1974).

Rolul canaliculelor transversale constă în preluarea semnalelor excitatoare de la membrana presinaptică (celula nervoasă) la nivelul membranei postsinaptice (celula musculară) şi transmiterea lor spre interior.

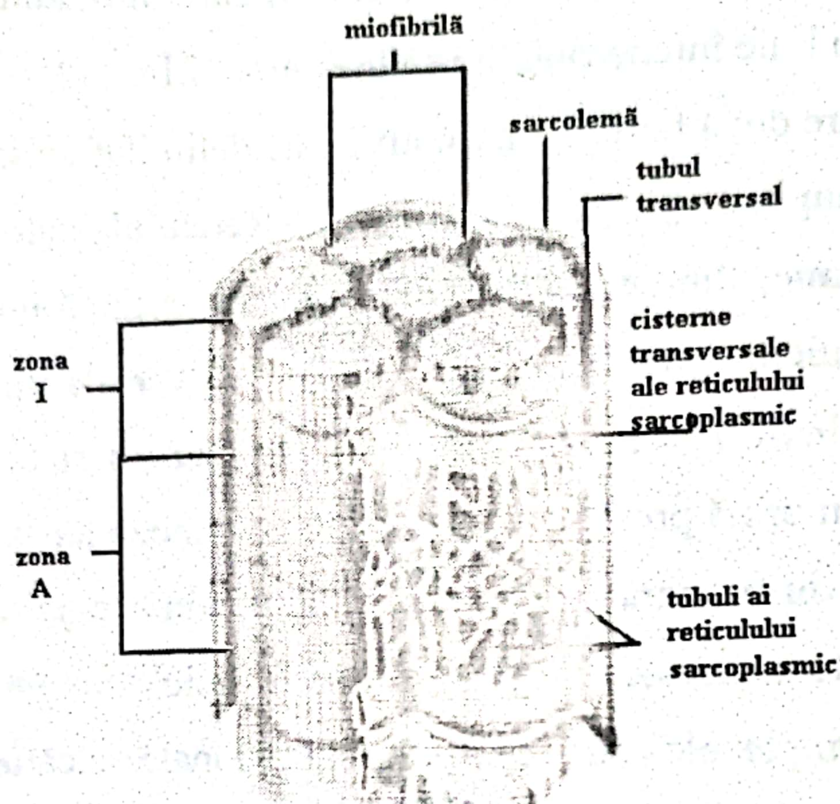


Figura 120. - Imagine tridimensională a unui ansamblu de şase miofibrile. Se observă tubulii transversali, longitudinali şi cisternele reticulului sarcoplasmic (J. Darnell şi col. 1990)

Mitocondriile din celula musculară (sarcozomii) sunt sediul unei intense activităţi enzimatice prin care se eliberează mari cantităţi de energie prin procesele de fosforilare oxidativă pentru a se stoca parţial în moleculele macroergice cum sunt cele de ATP şi PC (creatinfosfat - un fosfagen specific vertebratelor).

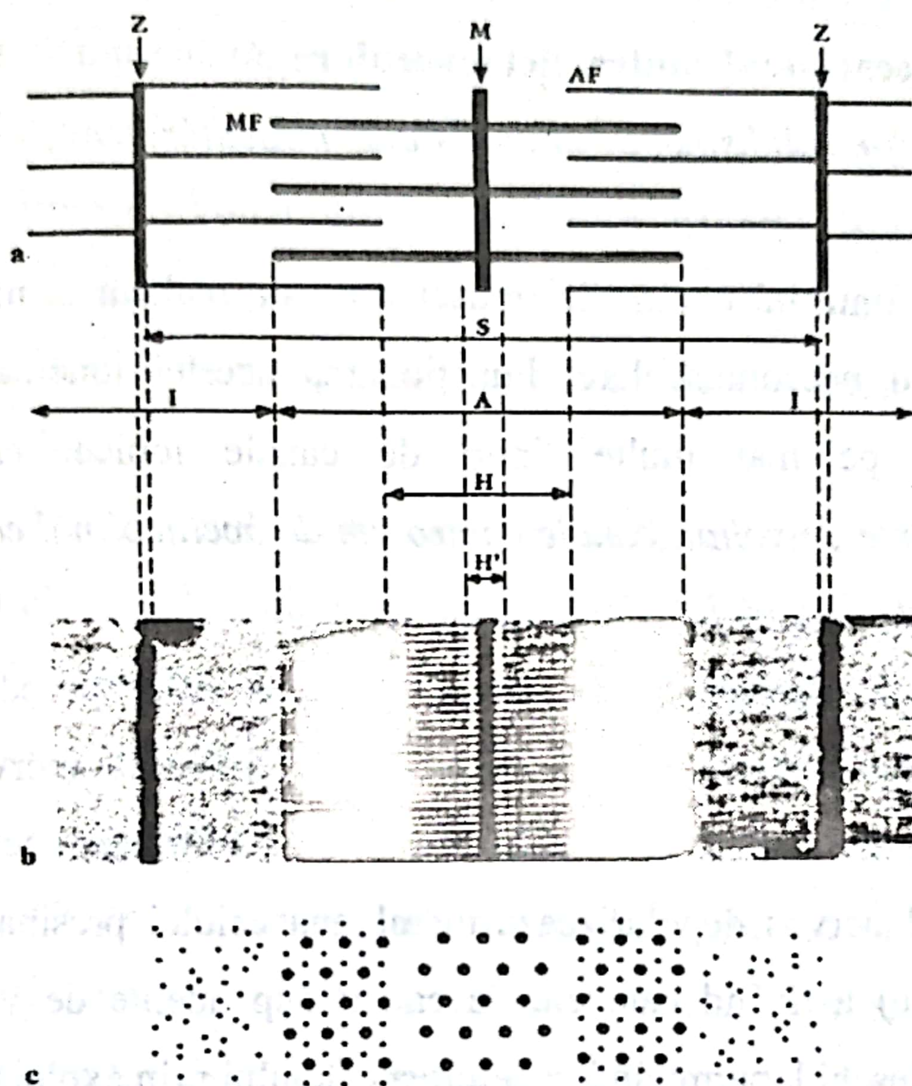


Figura 121. **a** - Imaginea striată a miofibrilelor din componenţa muşchiului striat, aşa cum apare la microscopul electronic; **b** - Reprezentarea schematică a imaginii propriu-zise obţinută la microscopul electronic; **c** - Reprezentarea schematică a secţiunilor transversale de la diferite niveluri ale sarcomerului (cercurile mari corespund filamentelor groase iar cercurile mici filamentelor subţiri) (W. Hope şi col. 1983)

18.2. Mecanismul contracţiei musculare

18.2.1. Controlul sinaptic al contracţiei musculare

Controlul contracţiei musculare este realizat la nivelul joncţiunii neuromusculare. Funcţionarea acestei joncţiuni se bazează pe mai multe tipuri de canale ionice: *canale dependente de voltaj, canale controlate de acetilcolină, canale controlate de ioni de calciu.*

Joncţiunea este activată de impulsul nervos care se propagă în celula nervoasă până la nivelul terminalului care inervează celula musculară (face sinapsă chimică cu această celulă). Impulsul nervos depolarizează membrana celulei presinaptice (nervoase) activând canalele de calciu dependente de voltaj, care se deschid, permiţând penetrarea calciului prin axolemă (în mod normal concentraţia de calciu extracelular este superioară cu câteva ordine de mărime celei din citoplasmă). Imediat se eliberează în spaţiul sinaptic vezicule cu acetilcolină din butonul terminal al celulei nervoase.

Moleculele de acetilcolină sunt receptate la nivelul membranei postsinaptice de receptorii de acetilcolină din constituţia canalelor ionice pentru cationi, care sunt canale ionice controlate de acetilcolină. Deschiderea acestor canale

înseamnă în primul rând un influx masiv de ioni de sodiu în celula musculară. Aceştia depolarizează membrana postsinaptică determinând activarea unor canale de sodiu dependente de voltaj. În timp, acetilcolina este degradată în spaţiul sinaptic receptorii membranari se eliberează şi ei devenind disponibili pentru receptarea de noi molecule de acetilcolină.

Mecanismul de activare, în continuare, a canalelor de calciu din membranele depozitelor intracelulare de calciu de la nivelul reticulului sarcoplasmic din celula musculară, nu este suficient de bine cunoscut, dar rolul său este esenţial în contracţia musculară.

Contracţia musculară se declanşează ca urmare a creşterii concentraţiei citoplasmatice de calciu, în principal prin golirea acestor cisterne de calciu intracelular. Reumplerea lor se realizează prin intermediul pompelor de calciu, existente în membranele acestor organite celulare.

18.2.2.Cuplul excitaţie-contracţie

Depolarizarea membranei celulei musculare, sarcolema, (determinată de impulsul nervos care acţionează la nivelul joncţiunii neuromusculare) este transmisă spre interiorul celulei

prin intermediul canaliculelor transversale ale reticulului sarcoplasmic. Este vorba de activarea unor canale de calciu sensibile la voltaj din sarcolemă (ca urmare a depolarizării sarcolemei), care sunt cuplate cu canalele de calciu de la nivelul membranei reticulului sarcoplasmic. Canalele de calciu astfel activate permit extruzia calciului prin transport pasiv.

Cisternele de calciu de la nivelul reticulului sarcoplasmic se descarcă determinând modificarea concentrației de calciu din citoplasmă de la 10^{-8} M (în lipsa excitației) până la 10^{-6}-10^{-5} M. Ionii de calciu activează sistemul troponină - tropomiozină. (Figura 122)

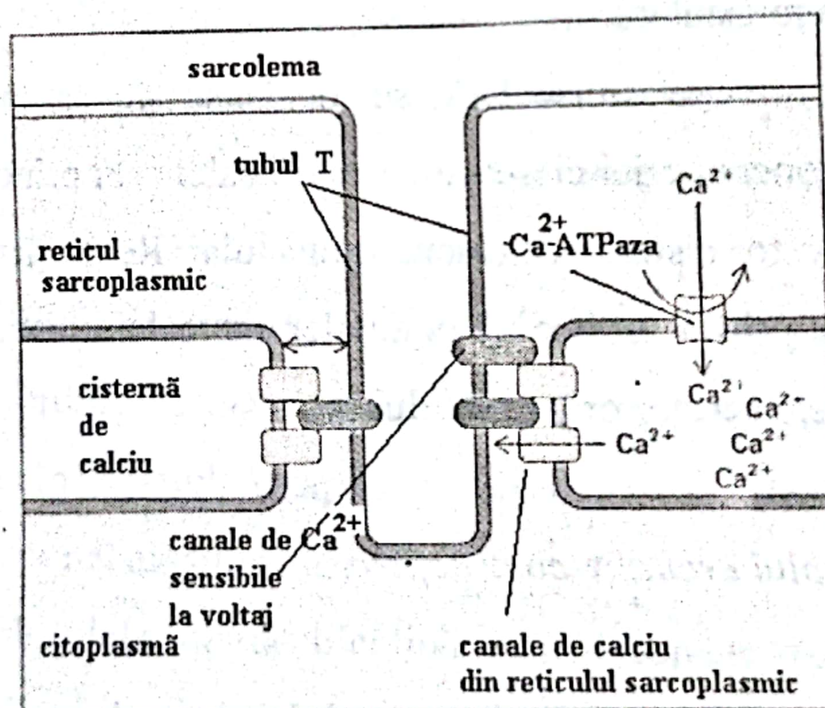


Figura 122. - Depozitele intracelulare de calciu, canalele şi pompele ionice de calciu din membranele acestora (J. Darnell şi col. 1990)

Troponina reprezentată din trei subunităţi: TnC, TnI, TnT. La o concentraţie mică de calciu intracelular subunitatea TnI este cea care se leagă la filamentul de actină blocând contracţia. La o concentraţie mare de calciu intracelular subunitatea TnC poate cupla în mod reversibil până la patru ioni de calciu, activând aparatul contractil al celulei. Subunitatea TnT interacţionează cu celelalte două subunităţi conectându-le precum şi cu tropomiozina (Tm). Moleculele de troponină interacţionează cu filamentele de tropomiozină care se împletesc cu cele de actină.

Activarea sistemului troponină - tropomiozină antrenează glisarea filamentelor de actină printre cele de miozină (Maenhout M. and all., 1998).

In acest fel contracţia musculară în final se realizează prin întrepătrunderea filamentelor de actină cu cele de miozină.

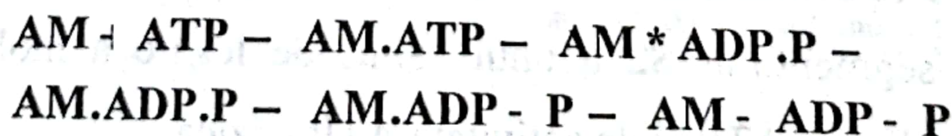
În prezenţa ionilor de magneziu, segmentele S2 ale miozinei, ca urmare a semnalului dat de creşterea concentraţiei citoplasmatice de ioni de calciu, se cuplează cu monomeri de actină din constituţia filamentelor subţiri. Se formează astfel complexele actină - miozină bogate în energie, prin existenţa la nivelul segmentului S2 a unui situs de legare a moleculei macroergice de ATP şi de activitate ATP - azică.

Odată cu formarea complexului acto – miozinic, molecula de ATP aferentă se scindează în ADP şi fosfat eliberând energie şi în acest fel se poate efectua o micşorare a unghiului dintre S2 şi direcţia filamentului cu circa 54 de grade. Deoarece cuplajul miozinei cu actina se menţine, această deformare mecanică se traduce tocmai prin glisarea filamentului de miozină faţă de cel de actină, adică scurtarea sarcomerului, realizându-se astfel o deplasare de circa 100 Å (Ångstromi) pentru fiecare sarcomer. (Figura 123)

Pentru decuplarea filamentului de miozină de cel de actină este necesară ataşarea unei noi molecule de ATP din citoplasmă (complexul actomiozinic a rămas sărac în energie). Din acest moment asistăm la reluarea mecanismului ciclic contractil (Haulică I. şi Topoliceanu F.,1999)

În lipsa moleculelor de ATP din citoplasmă miofibrilele nu mai pot ieşi din starea de contracţie, fenomen de rigiditate spastică cunoscut sub numele de *rigor*.

O schemă a transformărilor prin care trece complexul acto - miozinic ATP - azic poate fi redată astfel:



AM + ATP – AM.ATP – AM * ADP.P –
AM.ADP.P – AM.ADP - P – AM - ADP - P

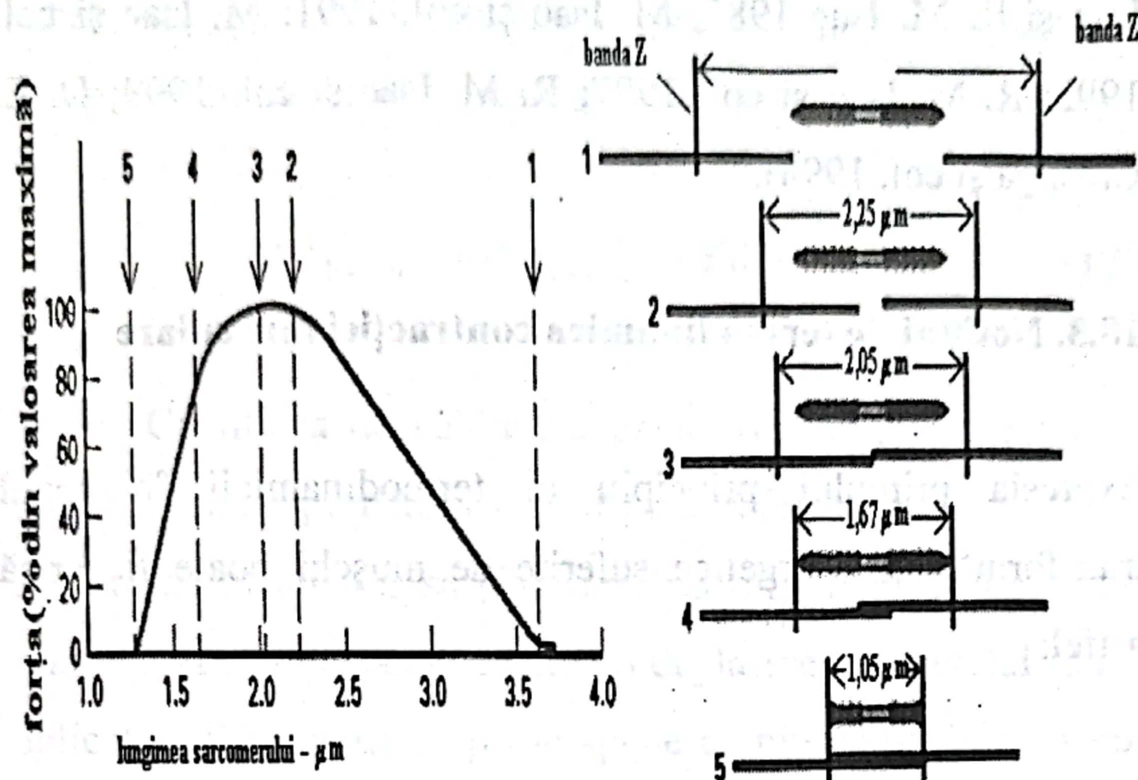


Figura 123. - Relaţia dintre lungimea sarcomerului şi forţa generată în timpul contracţiei izometrice (după J. Darnell şi col. 1990)

unde: **AM** este complexul actomiozinic bogat în energie, **AM*** este complexul actomiozinic dezenergizat, iar **P** este gruparea fosfat.

Interesul deosebit suscitat de problematica complexă a contracţiei musculare, de factorii care pot influenţa mecanismele energetice implicate, a condus la o serie de studii sistematice întreprinse şi în ţara noastră, cu sprijinul unor universităţi din Germania, Elveţia şi Suedia (M. Isac şi R. M.

Isac 1984; M. Isac şi col. 1984; F. Topoliceanu şi col. 1984; M. Isac şi R. M. Isac 1985; M. Isac şi col. 1991; M. Isac şi col. 1992; R. M. Isac şi col. 1997; R. M. Isac şi col. 1999; D. E. Creangă şi col. 1998).

18.3. Noţiuni de termodinamica contracţiei musculare

Expresia primului principiu al termodinamicii în cazul transformărilor energetice suferite de muşchi poate fi scrisă astfel:

$$dU = dQ + Fdl + dU_{ch} \qquad (178)$$

unde: **d*l*** este variaţia de lungime a muşchiului sub acţiunea forţei constante **F**, **dU** este variaţia energiei interne, **dQ** este cantitatea de căldură schimbată cu exteriorul iar **dU_{ch}** reprezintă variaţia de energie sub formă de energie chimică.

Contracţia musculară se referă atât la cazul când muşchiul dezvoltă forţă (tensiune) fără a-şi modifica lungimea - *contracţia izometrică* - cât şi la cazul când muşchiul îşi reduce lungimea sub acţiunea unei forţe constante - *contracţia izotonică*.

Dacă se consideră un muşchi izolat care nu schimbă substanţă cu mediul, atunci se poate neglija schimbul de energie chimică şi avem cazul contracţiei izotonice:

$$dU_{F=const} = dQ_{F=const} + Fdl \qquad (179)$$

Cantitatea de căldură degajată de muşchi la fel ca şi lucrul mecanic pe care acesta îl poate efectua depind, în mod evident de încărcarea sa (forţa). Când forţa ajunge la valoarea maximă la care se poate efectua o deplasare a punctului său de aplicaţie (F_0), atunci se poate spune că muşchiul funcţionează în condiţii izometrice. Deci pentru:

$$l = const \qquad (180)$$

avem:

$$dl = 0 \qquad (181)$$

iar variaţia energiei interne se regăseşte numai sub formă de căldură:

$$dU_{l=const} = dQ_{l=const} \qquad (182)$$

S-a arătat că energia totală eliberată de un muşchi este mai mare în cazul contracţiei izotonice decât în cazul contracţiei izometrice (efect Fenn) şi poate fi scrisă ca:

$$\frac{d\left(U_{F=const} - U_{l=const}\right)}{dt} = \frac{d\left(Q_{F=const} - Q_{l=const}\right)}{dt} + \frac{Fdl}{dt} \qquad (183)$$

Ultimul termen din membrul al doilea reprezintă puterea dezvoltată.

Studiile efectuate asupra dependenţei variaţiei de energie internă în funcţie de variaţia de căldură (în cele două tipuri de contracţii musculare) au arătat că randamentul maxim al producerii de lucru mecanic corespunde la o forţă egală cu 30% din $\mathbf{F_0}$.

Între forţa care acţionează asupra muşchiului şi viteza de contracţie s-a găsit pe cale empirică (A. F. Hill, 1930) o relaţie de forma:

$$(F + a)(v + b) = const. = (F_0 - a)b \qquad (184)$$

unde: **a** şi **b** sunt constante cu dimensiunile unei forţe, respectiv a unei viteze şi sunt specifice fiecărui tip de muşchi. Este

evident că valoarea maximă a forţei, F_0, corespunde unei viteze nule de contracţie. Dacă se scoate expresia vitezei de contracţie din relaţia anterioară atunci se obţine:

$$v = \frac{(F_0 - F)b}{F + a} \quad (185)$$

de unde se obţine şi valoarea maximă a vitezei:

$$v_{max} = \frac{F_0 b}{a} \quad (186)$$

ceea ce corespunde contracţiei libere (**F=0**).

Relaţia stabilită de Hill s-a bazat pe observaţii experimentale efectuate asupra muşchiului sartorius de la broască şi se referă la posibilitatea acestuia de a se contracta în condiţiile în care este tetanizat (K. A. P. Edman,1975). Astfel muşchiul se menţine la lungime constantă prin fixarea capetelor sale. El este stimulat electric la o tensiune şi frecvenţă suficient de mare, astfel ca în muşchi să se dezvolte tensiunea maximă F_0 pentru lungimea fixată. În acest moment muşchiul tetanizat se lasă liber la unul din capete sub acţiunea unei forţe de tensiune **F** mai mică decât valoarea maximă atinsă anterior.

Muşchiul începe să se contracte cu viteza **v.** Modificând valoarea forţei de tensiune se modifică şi valoarea vitezei de contracţie. Graficul de variaţie **F(v)** are forma de mai jos şi este bine aproximat de relaţia dedusă empiric de Hill (Figura 124).

Studii amănunţite efectuate ulterior au arătat că relaţia stabilită de Hill este riguros exactă numai în domeniul de valori de la 0,9 la 1,25 pentru raportul dintre lungimea muşchiului în timpul contracţei (*l*) şi lungimea sa iniţială (l_0).

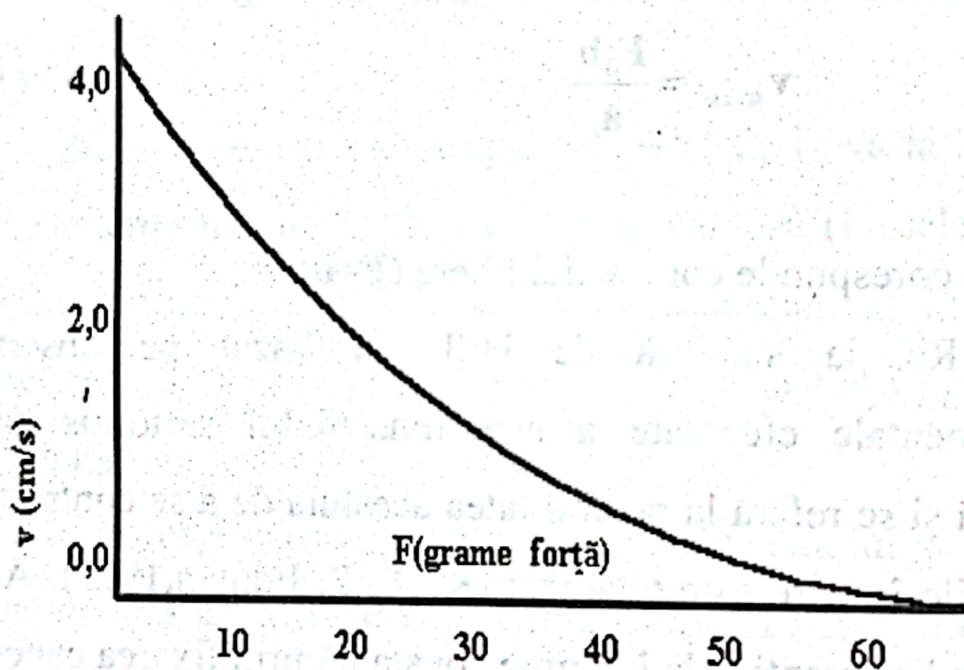


Figura 124. - Dependenţa vitezei de contracţie de forţa de tensiune în cazul muşchiului tetanizat (după M. Isac 1987)

18.4. Modelul fizic al musculaturii cardiace

Pentru explicarea numeroaselor rezultate ale cercetărilor care au urmărit comportarea elementelor active ale musculaturii

cardiace sub acţiunea forţelor de solicitare mecanică, (Edman şi Nilsson 1968) s-au propus relaţii cantitative de tipul celei de mai jos:

$$\frac{dF}{dl} = \alpha(F + \beta) \qquad (187)$$

unde: **F** este forţa de întindere, de exemplu, ***l*** este alungirea iar **α** şi **β** sunt constante. Relaţia este evident diferită de legea deformărilor elastice (relaţia 187):

$$\frac{F}{\Delta l} = \frac{ES}{l_0} \qquad (188)$$

în care raportul dintre forţa elastică şi alungirea cauzată este egal cu raportul unor constante: **E**-modulul de elasticitate, **S**-suprafaţa secţiunii transversale şi l_0 lungimea iniţială. Se vede că în relaţia (185) propusă mai sus, acest raport nu mai este constant, ceea ce echivalează cu a spune că modulul de elasticitate variază sub acţiunea forţei.

Modelul fizic corespunzător este cel al unui resort cu modul de elasticitate proporţional cu valoarea forţei care îl solicită (Figura 125).

Integrarea ecuaţiei diferenţiale de ordinul întâi presupune separarea variabilelor:

$$\frac{dF}{F+\beta} = \alpha d l \qquad (189)$$

Prin integrare se obţine o relaţie logaritmică:

$$\ln(F - \beta) = \alpha l - C \qquad (190)$$

unde C este o constantă de integrare ce se poate explicita din condiţiile iniţiale. Astfel, să punem condiţia că la o valoare F_0 a forţei, lungimea este l_0:

$$\ln(F_0 - \beta) = \alpha l_0 - C \qquad (191)$$

Înlocuind expresia care rezultă pentru constanta de integrare se obţine:

$$\ln(F - \beta) = \alpha(l - l_0) - \ln(F - \beta) \qquad (192)$$

Compactând cei doi logaritmi şi trecând la forma exponenţială obţinem:

$$F + \beta = (F_0 + \beta)e^{\alpha(l - l_0)} \qquad (193)$$

Valoarea constantei α în cazul musculaturii cardiace la pisică se obţine ca fiind egală cu 0,4 pentru o secţiune transversală cu suprafaţa de 0,98 mm^2, o preîncărcare de 0,5 g şi o extensie elastică de 4 - 5% din lungimea iniţială pentru o tensiune dezvoltată de 1g/cm^2 (corespunzător unei încărcări de 10 g), în timp ce constanta β corespunde la valoarea de 2g.

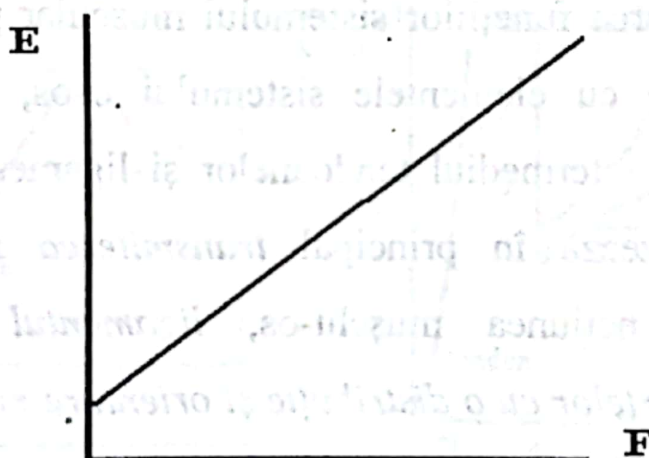


Figura 125. - Modulul de elasticitate al unui muşchi cardiac depinde liniar de forţa de tensiune aplicată.

Expresia acestei a doua constante rezultă ca o funcţie de prima din condiţia ca la o forţă nulă ($F = 0$) să corespundă o alungire nulă ($l = 0$):

$$\beta = \frac{F_0 e^{-\alpha l_0}}{1 - e^{-\alpha l_0}} \qquad (194)$$

În formă grafică măsurătorile experimentale conduc la o dreaptă ce descrie variaţia liniară a modulului de elasticitate cu mărimea forţei: **E = f(F)** (Figura 125).

18.5. Elemente de biomecanica tendonului şi ligamentelor musculaturii striate

Exercitarea funcţiilor sistemului muscular presupune o bună joncţiune cu elementele sistemului osos, ceea ce se realizează prin intermediul tendoanelor şi ligamentelor. Dacă *tendonul* realizează în principal *transmiterea uniaxială a forţelor* la joncţiunea muşchi-os, *ligamentul* efectuează *transmiterea forţelor cu o distribuţie şi orientare mai complexă* (câmpul de forţe rezistive se reflectă în direcţionarea fibrelor de colagen), cu caracter reversibil, asigurând deformări mai mari cu circa 20% decât tendonul (Wang, 1973).

Colagenul reprezintă circa 75-80% din masa uscată a tendonului, elastina mai puţin de 3%, iar proteoglicanii circa 1-1,5%, în timp ce la majoritatea ligamentelor elastina este în proporţie de 5% şi proteoglicanii sunt în proporţie de 2,5-3%

(dar conţinutul de elastină poate ajunge şi la 80% - vezi *ligamentum nucae* la bovine).

18.5.1. Proprietăţi de elasticitate

Curba tensiune - elongaţie a tendonului relevă proprietăţile sale de elasticitate şi este caracterizată de următoarele regiuni (Figura 126):

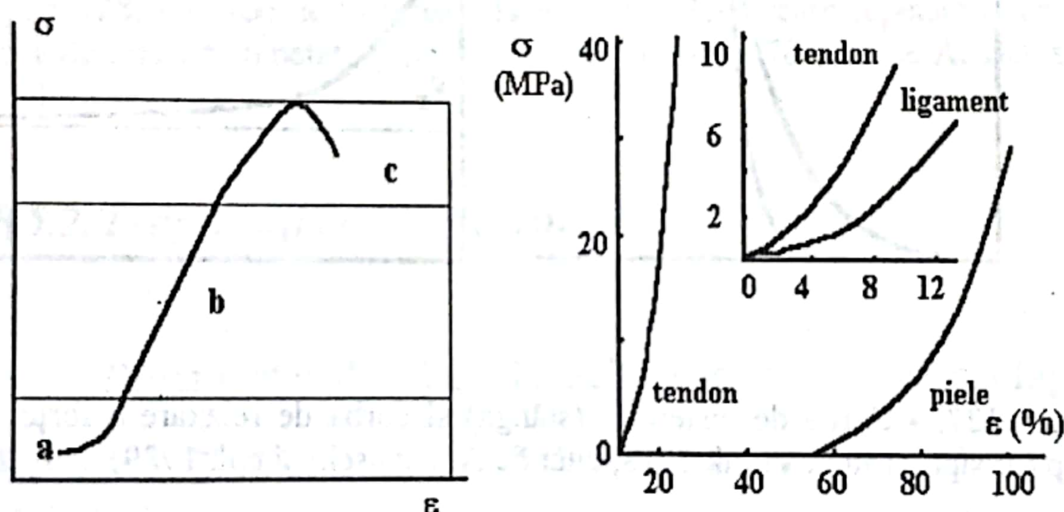


Figura 126. - Stânga: curba constrângere (efort unitar - elongaţie relativă, (σ(ε)) la tendon se caracterizează printr-o porţiune liniară centrală, între două porţiuni neliniare. Dreapta: curba constrângere - elongaţie relativă pentru tendon (porţiunea a), ligament şi piele (modificat după A. Denischi 1989)

(a) - *regiunea ascendentă lentă,* corespunzătoare proceselor neliniare de organizare a fibrelor de colagen şi a materialului necolagenic;

(b) - *regiunea ascendentă liniară,* în care se manifestă proprietățile de elasticitate ale tendonului;

(c) - *regiunea vârfului curbei,* ce corespunde proceselor neliniare de activare a proceselor vâscoase din rețeaua de colagen.

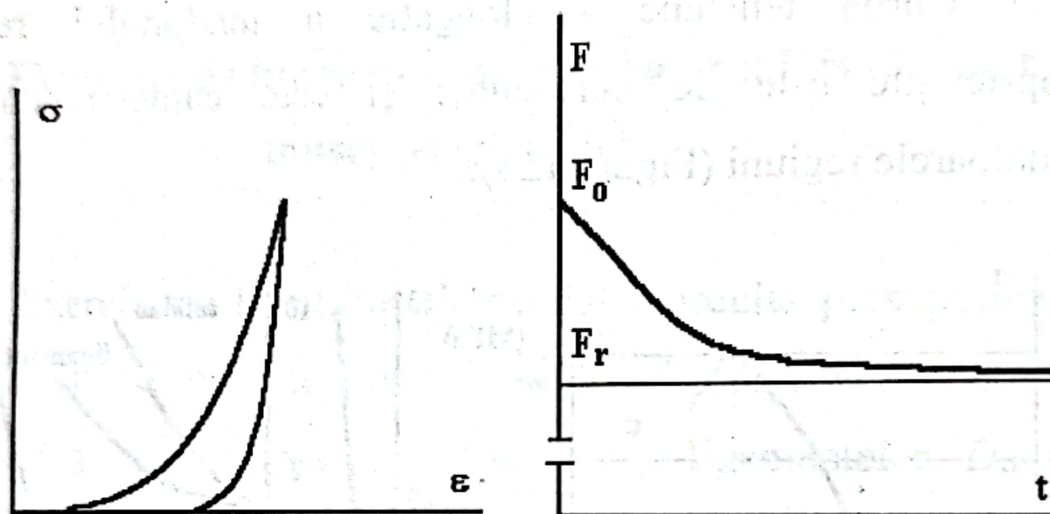


Figura 127. - Curba de histerezis (stânga) și curba de relaxare a forței în timp (dreapta) (după Viidik 1978, citat de A. Denischi și col. 1989).

Curbele experimentale de histerezis la încărcare - descărcare și curbele de relaxare a tensiunii la deformare constantă (Figurile 127-128) au relevat proprietățile de vâscoelasticitate ale structurilor colagenice din constituția tendonului.

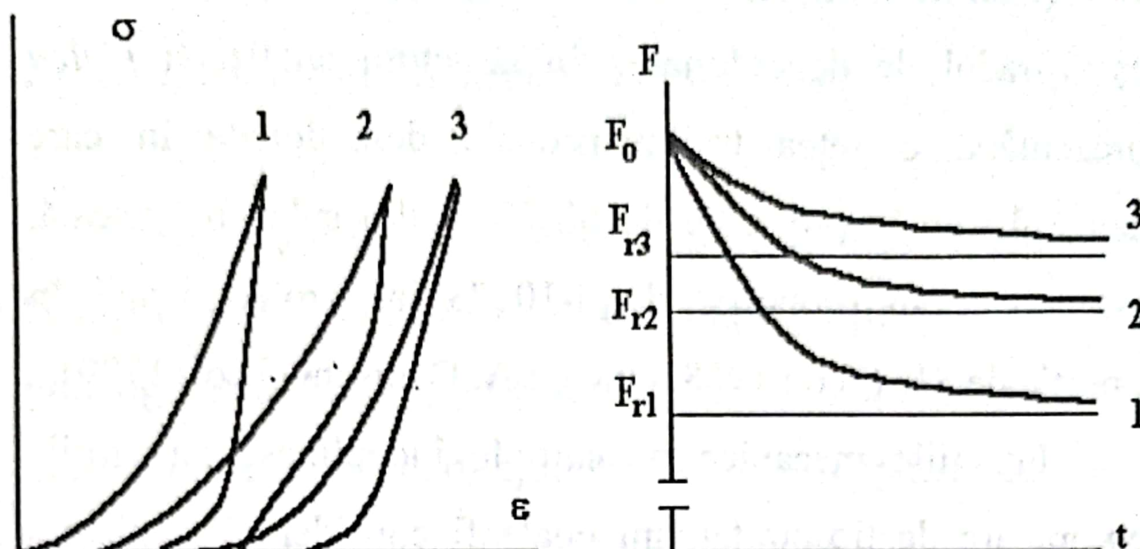


Figura 128. - Curbe de histerezis la încărcare-descărcare repetată (stânga); curbe de relaxare repetate (dreapta) (după Viidik, 1978 citat de A. Denischi şi col. 1989).

18.5.2. Proprietăţi de vâscoelasticitate

Proprietatea de vâscoelasticitate se manifestă prin faptul că, analog cu cazul pereţilor vaselor sangvine, o parte din energia de deformare elastică nu se restituie tot sub forma de energie mecanică ci se disipă sub formă de căldură, astfel că la scăderea constrângerii elongaţia nu mai scade la valoarea iniţială. Tensiunea din ţesut nu se mai reduce la aceeaşi valoare la repetarea experimentului de relaxare.

Comparaţia dintre proprietăţile elastice ale colagenului, tendonului, ligamentului şi ţesutului cutanat, arată că panta

curbei (dată de modulul de elasticitate, E) ,scade pe măsură ce creşte gradul de dezordonare din structura analizată: *pielea* reprezentând o reţea tridimensională dezordonată în care colagenul este în proporţie de 65-70 % din substanţa uscată, elastina este în proporţie de 5-10 % iar proteoglicanii în proporţie de 2% (Woo 1968, citat de A. Denischi şi col. 1989).

Funcţiile mecanice pe care le îndeplinesc structurile membranare de tip strat (cum poate fi considerată şi pielea) sunt legate de necesitatea de a rezista la *eforturi de întindere biaxială, forfecare laminară şi de apăsare verticală* în cazurile statice precum şi la *eforturi de pliere* în cazul mişcărilor segmentale.

În cazul dermului, gradul de organizare a reţelei de colagen diferă mult de la specie la specie, fiind, de exemplu, destul de înalt la nevertebrate, la care poziţia normală a corpului se bazează pe principiul tubului turgid (sub presiune) sau la peşti, unde fibrele sunt dispuse paralel, în straturi laminare dar fiind caracterizată de un nivel înalt de dezordonare la vertebrate unde se prezintă ca o reţea tridimensională, anizotropă.

18.5.3. Elemente de biomecanica tendonului şi ligamentului

Cartilajul conţine mai multă apă decât tendonul (70-80 % faţă de 65-70 %), colagenul este în proporţie de 60-65 % iar proteoglicanii în proporţie de 10-15 %. Faţă de structurile prezentate anterior cartilajul trebuie să îndeplinească funcţii mecanice de *rezistenţă la tensiuni de comprimare* precum *şi comportament specific la tensiunile de forfecare*, pentru asigurarea suportului şi formei, respectiv pentru limitarea fricţiunilor interosoase.

În viziune modernă, cartilajul este un material compozit, cu trei componente: populaţii de *celule* imersate într-o *matrice intercelulară* şi străbătute de un *sistem de fibre*. Cartilajul este văzut ca un ţesut complex cu aranjament fibros ultrastructural, biologic activ şi complex din punct de vedere reologic.

Pentru evaluarea proprietăţilor sale biomecanice, se definesc mărimi cum sunt: constrângerea Lagrangiană, **T** şi constrângerea Kirchhoff, **S**, astfel:

$$\mathbf{T} = \frac{\mathbf{F}}{\mathbf{A_0}} \quad (195)$$

$$\mathbf{S} = \frac{\mathbf{T}}{\varepsilon} \quad (196)$$

unde : A_0 este aria secţiunii inţiale, a cartilajului netensionat, **F** este forţa de tensiune aplicată, **ε** este (deformaţia) elongaţia relativă. Experimente *in vitro* cu cartilajul articular femural bovin, imersat în soluţie salină la 37 grade Celsius şi tensionat ciclic în intervalul **λ∈(1.07-1,10)** au arătat că **T** scade de la 24 MN/m^2 la 12 MN/m^2 în decurs de opt secunde (Woo 1979 citat de Y. C. Fung 1981).

Osul se prezintă tot ca un material compozit cu trei elemente: celulele osoase, fluidul extracelular şi materialul solid extracelular, numit matrice osoasă. Din punct de vedere chimic, este un ansamblu de structuri de colagen şi hidroxiapatită, astfel că şi din punct de vedere mecanic prezintă un model de elasticitate (modelul lui Young) cu valori intermediare între cele ale colagenului şi hidroxiapatitei şi o duritate mai mare decât a oricăreia din cele două componente chimice (Haulică I. Şi Topoliceanu I.,1999 ; Baran D.and all.,1999).

În funcţie de maniera concretă de structurare a ţesutului osos proprietăţile elastice, vâscoelastice şi de rezistenţă mecanică pot fi mult diferite. Matricea osoasă este solidă. Fluidul extracelular din ţesutul osos este în contact cu plasma

sangvină prin intermediul căreia se alimentează cu materialul necesar sintezei matricei osoase (Stratone A. and all.,1999).

Un model matematic al procesului constitutiv trebuie să ia în considerare următoarele: vitezele de generare chimică a matricei osoase **u(v, ε**$_{ij}$), fracţia volumică de matrice generată, **v**, viteza de variaţie a fracţiunii volumice, $\dot{v}$, densitatea de masă locală, **ρ**. Dacă se cunosc valorile lui **u** şi **E** atunci ecuaţiile de formare pe cale internă se pot propune de forma:

$$\dot{v} = \frac{u(v, \varepsilon_{ij})}{\rho} \qquad (197)$$

$$\sigma_{ij} = vE_{ijkl}(v)\varepsilon_{kl}$$

unde : indicii de sumare **i, j, k, l** variază după cele trei direcţii iar deformaţiile sunt de forma:

$$\varepsilon_{ij} = \frac{1}{2}\left(\frac{\partial l_i}{\partial x_j} + \frac{\partial l_j}{\partial x_i}\right) \qquad (198)$$

(l_i fiind deplasările iar x_1, x_2, x_3 cele trei direcţii carteziene). Deci , anizotropia procesului este redată prin intermediul tensorilor corespunzători atât fracţiunii de creştere volumică,

constrângerii, deformaţiei relative (tensori de ordinul doi) cât şi modulului lui Young (tensor de ordinul patru).

Pentru a exprima şi creşterile pe cale externă atunci se va considera că avem un sistem de coordonate carteziene cu direcţia x_3 normală la o suprafaţă considerată a osului (Figura 129) şi cu direcţiile x_2 şi x_1 în planul suprafeţei, în raport cu care viteza de creştere a suprafeţei în direcţia x_3 este **U**:

$$U = k_{11}\left(\varepsilon_{11} - \varepsilon_{11}^{0}\right) + k_{22}\left(\varepsilon_{22} - \varepsilon_{22}^{0}\right) + k_{12}\left(\varepsilon_{12} - \varepsilon_{12}^{0}\right) \qquad (199)$$

în care : k_{11}, k_{22}, k_{12}, şi $\varepsilon_{11}^{0}, \varepsilon_{22}^{0}, \varepsilon_{12}^{0}$ sunt constante.

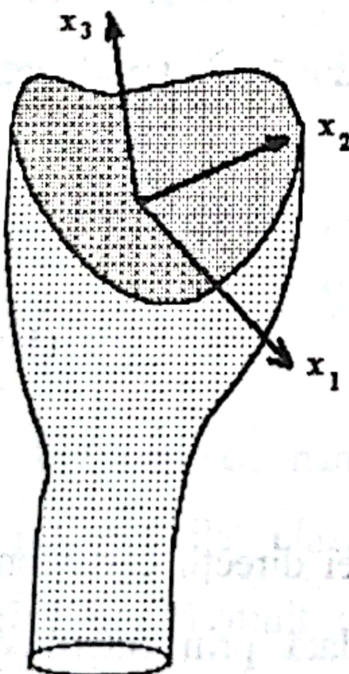


Figura 129. Sistemul de axe ataşate unei suprafeţe osoase pentru modelarea matematică a creşterilor

Dacă în relaţia 199, membrul drept este de o valoare pozitivă, atunci suprafaţa considerată este în curs de mărire, iar dacă

avem o valoare negativă atunci suprafaţa considerată este în curs de reducere. Pentru ca această ecuaţie să reflecte şi acţiunea de remodulare a suprafeţei osului pe baza forţelor ce acţionează asupra acestuia, ea trebuie să ia forma:

$$U = k_{ij}\left[\varepsilon_{ij}^{\ 2} - \left(\varepsilon_{ij}^{\ 0}\right)^{2}\right] \quad (200)$$

Cu aceste ecuaţii se pot determina distribuţiile constrângerilor şi deformaţiilor în ţesutul osos şi se pot anticipa remodelările acestuia din surse interne şi externe.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D., (1989), Molecular Biollogy of the Cell, Garland Publishing, Inc., New York, London
2. Apostol I., Topoliceanu F., Stratone A., Botez P., Olaru D., Budescu E., Costin H., Matei D., Cojocaru C., Ciupilan D., Ciorap R., Gura A., (1999): Ergometric and electrophysiologic explorations of the joint – muscle system biomechanics, XV^{eme} Session des Journées Médicales Balkaniques ,Programme,nr.7.
3. Aurengo A., Auvert B., Gremy F., Leterrier F., Petitclearc T., Biophysique, (1982), Ed. F. Gremy, Flammarion
4. Baran D., Topoliceanu F.,(1999) : Cell and tissue peculiarities of microvascular networks, XV^{eme} Session des Journées Médicales Balkaniques , Programme,nr.49.
5. Baran D., Munteanu F., Corciova C., (1999): Cytohistologic patterns of arthropathic diarthrodial joint envolvement, , XV^{eme} Session des Journées Médicales Balkaniques ,Programme,nr.10.
6. Benga Gh., Biologia membranelor şi aplicaţii medicale, (1976), Ed. Dacia, Cluj Napoca
7. Berredge M., (1985), The molecular basis of communications within the cell, Scientific American, 253(4): 142-150
8. Best R., Taylor K., Bazele fiziologice ale practicii medicale, (1984), Ed. Medicalã, Bucuresti
9. Cernea P., Constantin F., Vederea culorilor, (1977), Ed. Scrisul românesc, Craiova
10. Chabre M., (1985), From the Photon to the Neuronal Signal, Europhysics News, 16, 5:1-5.
11. Cosens D., LeBlanc N., (1980), Frequency dependent flicker response enhancement in the lamina ganglionaris of *Drosophila*, J. Comp. Physiol., 137: 341-351
12. Creangă D.E,. Isac M., Isac R.M., Ursu D., (1997), The light beam wavelength and flashing frequency influence on the fly electroretinogram, Physiology, (Official J. of the Rom. Soc. of Physiol. Sci.), 7, 2 (14):31-36
13. Creangã D.E., (1997), The blue light effect on the eye sensitivity, Balkan Physics Letters, 5: 1936-1940
14. Creangă D.E., (1999), A semi-quantitative insight in the visual system dynamics, acceptatã pentru comunicare la 11th,NBCBE99, Medical & Biological Engineering & Computing , 37, 1,345-357

15. Creangă D.E., Cernea M., Băra I.I., Tufescu Fl. M., (1996), The influence of the microwave treatment on some phenotypical parameters of *Secale cereale* L., Rev. Roum. de Biol., 41, 1, 45-51
16. Creangă D.E., Isac M., Isac R.M., (1997), Selective interaction model and photoreceptor cell membrane, J. of Biol. Phys., Olanda, 23, 143-149
17. Creanga D.E., Isac M., Isac R.M., Ursu D., (1997), Fly eye phototransduction for different lighting parameters, în Abstract book of the 11th Balkan Biochemical Biophysical Days, Thessaloniki, Greece, 62
18. Creangă D.E., Isac. M, Isac, R.M., (1997), Molecular phenomena induced by light action on visual cell membranes-mathematical modeling, Roum. J. of Optoelectronics, 5, 2: 164-168
19. Creangă D.E., Morariu V. V., Isac R.M., Ursu, D., (1998), Quasi-nullgeomagnetic field influence on the eye bioelectrogenesis, EMMA98 Conference, Zaragoza, Spania, Abstract book, 101
20. Creangă D.E., Sprott J.C, Ursu D., Isac R.M., (1998), A complexity analysis upon the sensitivity of the fly visual system to the light intensity, Int. J. of Chaos Theor. and Appl., Laussane, Elveția, Vol.3, No.3, 21-33
21. Creangă D.E., Stan C., Isac M., Isac R.M., (1997), Some quantitative aspects concerning bioelectrogenesis in *Drosophila melanogaster* eye, Physica Medica, XIII, 1, 86-87
22. Creangă D.E., Tufescu Fl.M., Cernea M., Băra I.I., (1995), Some quantitative aspects concerning the low intensity microwave influence on the *Secale cereale* L. individuals, Rom. J. of Biophys., 5, 2-3, 153-159
23. Crețeanu G., Haulică I., Topoliceanu F., Riegler B., Petrescu G. (1968): Cercetări privind influența Riboflavinei asupra transportului activ de ion. Rev. Med. Chir., nr.1, p.91
24. Cruce M.,Cruce R.,Zaharia B., Simionescu D.,Simionescu A., Deac R.(1997):Adeziunea celulară și matricea extracelulară.Editura Aius,Craiova
25. Darnell J., Lodish H., Baltimore D., (1990), Molecular Cell Biology, Scientific American Books, New York, 7
26. Denischi A., Marin I.Gh., Antoniescu D., Petrescu R., (1989), Biomecanica, Ed.Acad. R.S.R.
27. Dimoftache C., Herman S., (1993), Biofizica medicală, Ed, Cerma, București,
28. Edman K.A.P.,(1975):Mechanical deactivation induced by active shortening in isolated muscle fibres of the frog.J.Physiol.(London) 246:255-275

29. Fung Y.C., (1981), Biomechanics-Mechanical Properties of Living Tissues, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
30. Gheorghe V., Popescu A., (1990), Introducere în bionică, Ed. Ştiinţifică, Bucureşti
31. Grémy F., Perrin J., (1975), Elements de Biophysique, Ed. Flammarion, Paris
32. Grémy F., (1982), Biophysics, Ed, Flammarion, Paris
33. Hardie R., Vogt K., Rudolph A., Laughlin S.B., Stavenga D.G., (1989), The compound eye of the tzetze fly (*Glossina morsitans morsitans* and *Glossina palpalis palpalis*), J. Insect. Physiol., 35, 5: 423-431
34. Hardie R.C,. Peretz A., Suss-Toby E., Rom-Glass A., Bishop S.A., Selinger Z., Minke B., (1993), Protein kinase C is required for light adaptation in *Drosophila* photoreceptors, Nature, 363: 634-637
35. Hardie R.C., (1984), Properties of photoreceptors R7 and R8 in dorsal marginal ommatidia in the compound eyes of Musca and Calliphora, J. Comp. Physiol. A., 154: 157-165,
36. Hardie R.C., (1986), The photoreceptor array of the dipteran retina, Trends in Neurosciences, 9: 419-423
37. Hardie R.C., (1995), Photolysis of cadged Ca^{2+} facilitates and inactivates but does not directly excite light sensitive channels in *Drosophila* photoreceptors, J. of Neurosciences, 15, 1: 889-902
38. Hardie R.C., Minke B., (1995), Phosphoinositide-mediated phototransduction in *Drosophila* photoreceptors: the role of Ca^{2+} and trp, Cell calcium, 18: 256-274
39. Hardie R.C., Peretz A., Suss-Toby E., Rom-Glass A., Bishop S.A., Selinger Z., Minke B., (1993), Protein kinase C is required for light adaptation in *Drosophila* photoreceptors, Nature, 363: 634-637
40. Hardie R.C., Stavenga K., (1989), Facets of vision, Springer Verlag, Berlin
41. Haulică I., Avram M., Stefan I., Topoliceanu F., Buznea R., Branişteanu D. (1968) : Cercetări privind influenaţa hipobarismului asupra reacţiilor de adaptare la effort. Rev. Med. Chir., nr.4, p.945.
42. Haulică I., Topoliceanu F., Haulică A., Ciurea E. (1968) : Comparative study of the effects of Carnosine and Homocarnosine on the transport of active ions.Symposium on Biophysical Aspect of Permeability, Jerusalim, (abstract) .
43. Haulică I., Topoliceanu F. şi col., (1989): Influenţa captoriului asupra circulaţiei coronariene , studiu clinico-experimental. Rev. Med. Chir. Iaşi, vol. 93,4,741 – 746.
44. Haulică I., Branişteanu D., Petrescu G., Rusu V., Neamţu C., Topoliceanu F., Petrescu Z., Slătineanu S., Stratone A., Carasievici

use during a supramaximal isokinetic muscle contraction, J.of Biomechanics, 31, 105.
85. Mărgineanu, D.G., Isac M., Tarba, C., (1980), Biofizica, Ed. Did. şi Ped., Bucureşti
86. Neamţu, S., Tamaş, V., (1986), Pigmenţi carotenoidici şi metaboliţi, Ed. Ceres, Bucureşti
87. Nicolau, Cl., Simon, Z., (1967), Biofizica moleculară, Ed. Ştiinţifică, Bucureşti
88. Pavel, A., Vlahovici, Al., Trifan, M., Băra I. I., Creangă, D.E., (1999), Influenţa lichidelor magnetice asupra unor specii de plante de interes farmaceutic, Rev. Med.Chirurg., 3-4, 67-73.
89. Petrescu O., Baran T., Topoliceanu F. şi Herşcovici H. (1974): Cercetări " in vitro" privind mecanismele de transport al iodurii în celulele tiroidiene. Simpozin Naţional de Biofizică, Tg.Mureş, (abstract).
90. Popescu A., (1994), Fundamentele biofizicii medicale, Ed. ALL, Bucuresti
91. Popescu, A.I., (1997), Biofizică moleculară şi supramoleculară, Ed. ALL, Buucreşti
92. Porumb, T., (1985), Biofizica moleculară, Ed. Dacia, Cluj Napoca.
93. Radu H.,(1978) : Patologia unităţii motorii, Editura Medicală, Bucureşti
94. Rasmussen, H., (1989), The cycling of calcium as an intracellular messsanger, Scientific American, 261(4): 66-73
95. Rosen, O.M., (1987), After insulin binds, Science, 237:1452-1458
96. Ruck, P., (1961), Electrophysiology of the insect dorsal ocellus III, J. Gen. Physiol., 44: 644-657, citat de de Cosens, D., Le Blanc N., (1980) în: Frequency dependent flicker response enhancement in the lamina ganglionaris of *Drosophila*, J. Comp. Physiol., 137: 341-351
97. Rush, K., Fulton, J., (1970), Fiziologie medicală si biofizică, Ed. Medicală, Bucuresti
98. Rusu, V., Baran, T., Brănişteanu, D.D., (1988), Biomembrane şi patologie, Ed. medicală, Bucureşti
99. Rűegg J. C., (1988), Calcium in Muscle Activation, Ed. Springer Verlag
100. Speck T., Mutz M., Ohl. S., Spatz , H.Ch., (1984), The electroretinogram of *Drosophila* to flickering light: the assesement of the contributions of receptor cells R7 and R8, J. Insect. Physiol., 30, 6: 437-440
101. Sprang S.R., Acharya K.R., Goldsmith E.J., Stuart D.I., Varvill K., Fletterick R.J., Madsen N.B., Johnson L.H., (1988), Structural

114.Topoliceanu F. şi Haulică I. (1971): Unele relaţii dintre Angiotensină, 3´5 AMP şi transportul transepitelial de Na. Internat. Conf. Physiol. and Pharmac. Of cyclic AMP, Milano, (abstract).
115.Topoliceanu F. Haulică I. şi col., (1972) : Compatarive study on Epsylonaminohexanoic acid (EAH) and Strophantine effects on the sodium trensepitelial trasfer. IV-lea Cogres Internaţional de Biofizică, Moscova, (abstract)
116.Topoliceanu F., Haulică I. şi col., (1984): Contributions a l´etude du phenomene myotonique realise experimentalment avec du 2,4-D chez le rat. 52eme Reunion de l´Association des Physiologistes, Bruxelles, p.203 (abstract)
117.Topoliceanu F., Haulică I.şi col., (1984): La valeur experimentale de la vessie urinaire de batracien dans l´etude de l´electrogenese spontanee du mucle lisse . 52eme Reunion de l´Association des Physiologistes, Bruxelles, p.205 (abstract).
118.Topoliceanu F. şi col., (1985): Cercetări privind modularea adrenergică a transportului de sodiu activ transepitelial.Conferinţa Naţională de Biofizică, Iaşi, p.101 (abstract)
119.Topoliceanu F., Haulică I. şi col., (1985): L´utilisation de la vessie urinaire de batracien en tane que moddele experimental dans l´etude de l´ electrogenese spontanee de type "pace-maker". Journees Franco-Roumaines de Biopysique Cellulaire et Medicine Nucleaire, Iaşi, vol. III, p.53, (abstract).
120.Topoliceanu F., Haulică I. şi col., (1987): Cercetări electrofiziologice şi de microscopie electronică privind activitatea electrocontractilă a vezicii urinare de batracian. Bull .Soc. Naţionale de Biologie Celulară, p.80, (abstract).
121.Zaharia D., Varvara G. şi Topoliceanu F. (1998) : Frequency analyssis of a microvascular resistence model depending on chaotic vasomotion. Proceeding of Medical Sciences Simulation Conference San Diego,174 - 177 .
122.Vasilescu V., (1977), Biofizica medicală, Ed. Did. şi Ped., Bucureşti
123.Wallis, D.I., ed., (1993), Electrophysiology-a practical approach, Oxford Universit y Press.
124.Warren T., (1995):Carbohydrate bioengineering, Edited by Petersen S.B., Svensson B., Pedersen S., Elsevier Science , vol.13, 447 – 450.

Autori:

Conf.univ.dr. Rodica Maria Isac
Disciplina de Biofizică medicală
Facultatea de Bioinginerie medicală
Universitatea de Medicină şi Farmacie
"Gr.T.Popa" Iaşi

Prof.univ.dr. Florin Topoliceanu
Decanul Facultăţii de Bioinginerie medicală
Disciplina de Explorări funcţionale
Facultatea de Bioinginerie medicală
Universitatea de Medicină şi Farmacie
"Gr.T.Popa" Iaşi

Şef lucr.dr. Dorina Emilia Creangă
Disciplina de Biofizică
Facultatea de Fizică
Universitatea "Al.I.Cuza" Iaşi

Referenţi ştiinţifici:

Prof.univ.dr. Valeriu Rusu
Decanul Facultăţii de Medicină Generală
Titularul Catedrei de Biofizică medicală
Universitatea de Medicină şi Farmacie
"Gr.T.Popa" Iaşi

Prof.univ.dr. Ioan Grosu
Titularul Catedrei de Fizică medicală
Facultatea de Bioinginerie medicală
Universitatea de Medicină şi Farmacie
"Gr.T.Popa" Iaşi



ISBN 973 – 9333 – 38 – 9

EDITURA APOLLONIA

Iași - România

Bun de tipar: 25-01-2002

Tiraj: 200 exemplare;

Hârtie tipar tip offset 60g/1m^2;

Format bobine de 61 cm lățime;

Tipar executat la:

S.C. ALPHA CENTAUR S.R.L.

Strada Uzinei, nr.59, Telefon 218380

"Functions must be understood in term of structures,
Structures must be understood in term of chemistry."

George Emil PALADE
NOBEL PREIS – 1974

Sperăm ca efortul nostru, concretizat în editarea unui prim volum din ciclul dedicat problemelor actuale ale disciplinelor de graniță biomedicale și tehnico-medicale, să reprezinte un început în formarea complexă, bio- și tehnico-medicală, a viitorilor specialiști în ***profesiunea de bioinginer medical****.*

Autorii

ISBN 973-9333-38-9

Tipar executat la S.C. ALPHA CENTAUR S.R.L.
str. Uzinei nr. 59, Iași, tel. 032-218380

